
BACHELORARBEIT

Frau
Grit Nancke

**Optimierung des In vitro
Testverfahrens „Glutathion-
Recycling-Assay“ zum Nachweis
von Schadwirkungen in
aquatischen Systemen**

Mittweida, 2012

BACHELORARBEIT

Optimierung des In vitro Testverfahrens „Glutathion- Recycling-Assay“ zum Nachweis von Schädwirkungen in aquatischen Systemen

Autor:

Frau

Grit Nancke

Studiengang:

Biotechnologie | Bioinformatik

Seminargruppe:

BI09-w2

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:

Dr. Tamara Grummt

Einreichung:

Mittweida, 24.08.2012

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2012

Bibliographische Beschreibung:

Nancke, Grit: Optimierung des In vitro Testverfahrens „Glutathion-Recycling-Assay“ zum Nachweis von Schadwirkungen in aquatischen Systemen. - 2012. - 6, 54, 0 S.
Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät MNI, Bachelorarbeit, 2012

Englischer Titel

„ Optimization of the in vitro method “glutathione-recycling assay” to proof harmful effects in aquatic systems “

Kurzbeschreibung:

Es wurden Untersuchungen des „Glutathion-Recycling-Assay“ zur Toxizitätsbewertung von trinkwasserrelevanten Reinsubstanzen und Wasserproben an Jurkat- und HEP G2-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die einzusetzende Zellzahl und der Zeitpunkt der Messung optimiert. Des Weiteren wurden die Proteinkonzentration und die eingesäte Zellzahl als Bezugsgröße für die Glutathionmessung untersucht. Zudem wurden zwei Substanzen (TBHP und BSO) auf ihre Eignung zur Positivkontrolle für dieses Verfahren an HEP G2- und Jurkat-Zellen geprüft. Die Validität der Methode wurde anhand statistischer Parameter untersucht.

Abstract:

Investigations of the glutathione recycling assay were carried out for the determination of toxicity of pure substances relevant for drinking-water and water samples using Jurkat and HEP G2 cells. Therefore the measuring time and the starting cell number were optimised. Besides the protein concentration and the starting cell number were examined for the use as a reference unit. Furthermore, two substances (TBHP and BSO) were checked for their suitability as positive controls for this method with HEP G2 and Jurkat cells. The validity of the method was examined by calculating of statistical parameters.

Danksagung

Bei der Erstellung meiner Bachelorarbeit haben mich viele Menschen unterstützt, denen ich hiermit meinen Dank aussprechen möchte.

Zunächst möchte ich meinen beiden Betreuerinnen Frau Prof. Radehaus und Frau Dr. Grummt für die fachliche Unterstützung und die Überlassung des interessanten Themas danken.

Bei meiner Ansprechpartnerin Frau Dr. Heinze möchte ich mich besonders bedanken. Ohne ihr Wissen, ihre Ideen und die konstruktiven Diskussionen mit ihr wäre die Bachelorarbeit nicht so weit gekommen.

Mein Dank richtet sich auch an alle Mitarbeiter des Fachgebietes II 3.6 „Toxikologie des Trink- und Badebeckenwassers“ des Umweltbundesamtes für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich wurde nicht nur sehr freundlich im Team aufgenommen, sondern auch während des gesamten Bearbeitungszeitraums in allen praktischen Fragen unterstützt.

In diesem Zusammenhang möchte ich besonders Herrn Skerswetat für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Versuche bedanken. Seine fröhlich-offene Art hat mich an so manchen Tagen vor der Verzweiflung gerettet.

Herrn Eckhardt möchte ich für seine konstruktiven Hinweise beim Schreiben der Arbeit und speziell bei englischsprachigen Formulierungen danken.

Nicht versäumen möchte ich, Frau Dölling für die Unterstützung in administrativen Angelegenheiten zu danken.

Zuletzt möchte ich mich noch sehr herzlich bei meiner gesamten Familie bedanken, ohne deren Unterstützung ein Studium und eine Bachelorarbeit nicht möglich gewesen wären.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
2 Zielstellung	8
3 Material.....	9
3.1 Reagenzien.....	9
3.2 Lösungen.....	10
3.3 Zellkulturen.....	12
3.4 Material	12
3.5 Geräte	13
4 Methoden	14
4.1 Einsaat und Belastung der Zellen	14
4.1.1 für Suspensionskulturen (Jurkat)	14
4.1.2 für adhärente Zellkulturen (HEP G2)	14
4.2 Zellaufbereitung.....	15
4.2.1 für Suspensionskulturen (Jurkat)	15
4.2.2 für adhärente Zellkulturen (HEP G2)	16
4.2.3 Bestimmung einer Bezugsgröße für die GSH _{total} - und GSSG-Konzentration	16
4.3 GSH _{total} -Messung	17
4.4 GSSG-Messung	17
5 Ergebnisse und Diskussion.....	19
5.1 Messzeitpunktoptimierung.....	19
5.2 Zellzahloptimierung.....	23
5.2.1 für Jurkat	23
5.2.2 für HEP G2	25
5.3 Proteinkonzentration und eingesäte Zellzahl als Bezugsgrößen für die Glutathionbestimmung.....	29
5.3.1 Jurkat.....	29
5.3.2 HEP G2	32
5.4 Untersuchung von geeigneten Positivkontrollen	35

5.4.1 Jurkat.....	35
5.4.2 HEP G2	37
5.5 Statistische Parameter	38
5.5.1 Linearität	38
5.5.2 Präzision.....	39
5.5.3 Richtigkeit.....	41
5.5.4 Wiederfindungsrate.....	44
5.5.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	45
6 Ausblick	47
7 Zusammenfassung	49
8 Summary.....	52
Literaturverzeichnis	VII
Selbständigkeitserklärung.....	XII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel des Glutathion, GSH [URL 1]	1
Abbildung 2: Strukturformel des Glutathion Disulfid, GSSG [URL 2]	2
Abbildung 3: Schädigung der DNA durch ROS, links Guanosin, rechts 8-oxo-dG (7,8-Dihydro-8-oxo--deoxy-guanosin) [URL 3]	3
Abbildung 4: Umwandlung des GSSG in GSH durch Glutathion-Reduktase.....	3
Abbildung 5: enzymatische GSH-Nachweisreaktion mit DTNB (siehe auch [Rahman et al, 2007])	4
Abbildung 6: Strukturformel von <i>tert</i> -Butylhydroperoxid (TBHP) [URL 5].....	6
Abbildung 7: Strukturformel von DL-Buthionin-(S,R)-Sulfoximin [URL 6].....	6
Abbildung 8: Kalibrierkurven für die GSH _{total} -Bestimmung zu unterschiedlichen Messzeitpunkten	20
Abbildung 9: Kalibrierkurven für die GSSG-Bestimmung zu unterschiedlichen Messzeitpunkten	21
Abbildung 10: Abhängigkeit der relativen Standardabweichung von der eingesäten Jurkat-Zellzahl/ml	24
Abbildung 11: Abhängigkeit des Aggregationsfaktors von der Jurkat-Zellkonzentration	24
Abbildung 12: Abhängigkeit der gemessenen Extinktionen bei GSH _{total} -Messungen von der eingesetzten Jurkat-Zellzahl	25
Abbildung 13: Abhängigkeit der relativen Standardabweichung von der eingesäten HEP G2-Zellzahl/ml	26
Abbildung 14: Abhängigkeit des Aggregationsfaktors von der HEP G2-Zellkonzentration	27
Abbildung 15: Abhängigkeit der gemessenen Extinktion bei GSH _{total} - und GSSG-Messungen von der eingesetzten HEP G2-Zellzahl	28
Abbildung 16: Abhängigkeit der Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation von der eingesäten Jurkat-Zellzahl	29
Abbildung 17: Abhängigkeit der GSH _{total} - bzw. GSSG-Konzentration von der jeweiligen Proteinkonzentration	30
Abbildung 18: Abhängigkeit der GSH _{total} - bzw. GSSG-Konzentration von der eingesäten Jurkat-Zellzahl	31

Abbildung 19: Abhängigkeit der Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation von der eingesäten HEP G2-Zellzahl.....	32
Abbildung 20: Abhängigkeit der $\text{GSH}_{\text{total}}$ - bzw. GSSG-Konzentration von der jeweiligen Proteinkonzentration	33
Abbildung 21: Abhängigkeit der $\text{GSH}_{\text{total}}$ - bzw. GSSG-Konzentration von der eingesäten HEP G2-Zellzahl.....	33
Abbildung 22: Senkung des [GSH]:[GSSG]-Verhältnis durch TBHP in Jurkat-Zellen	36
Abbildung 23: Senkung des [GSH]:[GSSG]-Verhältnis durch BSO in Jurkat-Zellen...	36
Abbildung 24: Prüfung der Linearität der GSSG- und $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Kalibrierkurve ($t = 5$ min).....	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sauerstoff-Verbindungen der Gruppe der ROS	2
Tabelle 2: Parameter der Messzeitpunkte für die GSH _{total} - und GSSG-Kalibrierkurven	22
Tabelle 3: gemessene GSH _{total} - und GSSG-Konzentrationen für unterschiedliche Jurkat-Zellzahlen (Einsaat)	23
Tabelle 4: gemessene GSH _{total} - und GSSG-Konzentrationen für unterschiedliche HEP G2-Zellzahlen (Einsaat)	26
Tabelle 5: GSH _{total} - und GSSG-Konzentrationen bei Belastung von Jurkat-Zellen mit TBHP oder BSO	35
Tabelle 6: Senkung des Glutathiongehaltes durch TBHP und BSO.....	36
Tabelle 7: GSH _{total} - und GSSG-Konzentrationen bei Belastung von HEP G2-Zellen mit BSO.....	37
Tabelle 8: Standardabweichung der GSSG-Konzentrationen zum Zeitpunkt t = 5 min	40
Tabelle 9: Standardabweichung der GSH _{total} -Konzentrationen zum Zeitpunkt t = 5 min	40
Tabelle 10: Überprüfung der Richtigkeit der GSSG-Messergebnisse (lineare Kalibrierkurve).....	41
Tabelle 11: Überprüfung der Richtigkeit der GSH _{total} -Messergebnisse (lineare Kalibrierkurve).....	42
Tabelle 12: Überprüfung der Richtigkeit der GSSG-Messergebnisse (quadratische Kalibrierkurve).....	43
Tabelle 13: Überprüfung der Richtigkeit der GSH _{total} -Messergebnisse (quadratische Kalibrierkurve).....	43
Tabelle 14: Wiederfindungsraten der GSH _{total} - und GSSG-Bestimmung bei Verwendung von linearen und quadratischen Kalibrierkurven.....	44
Tabelle 15: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der GSH _{total} - und GSSG-Messung mit linearer und quadratischer Kalibrierkurve.....	46

Abkürzungsverzeichnis

2-VP	2-Vinylpyridin
β -NADPH	β -Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form
BSO	Buthionin Sulfoximin
CMF-PBS	“Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline” ohne Ca^{2+} und ohne Mg^{2+}
DTNB	5,5 '-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure
FCS	Foetal Calf Serum, Kälberserum
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion, reduziert
$\text{GSH}_{\text{total}}$	Gesamtglutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid, oxidiert
GS-TNB	Glutathion-TNB-Addukt
KPE-Puffer	Kaliumphosphat-EDTA-Puffer
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleinimid
ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoff Spezies
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TEA	Triethanolamin
TNB	5'-Thio-2-Nitrobenzoesäure

1 Einleitung

Aquatische Systeme, wie z.B. Trinkwasser, Oberflächenwasser oder Abwasser können Schadstoffe enthalten, die die Nutzung des Wassers einschränken. Die Beurteilung der Wasserqualität kann anhand der Art und Konzentration der Inhaltsstoffe (analytisch) und deren Wirkung auf Lebewesen (toxikologisch, z.B. Saprobien-System für Fließgewässer) erfolgen. Für Aussagen zur Schädwirkung von bestimmten Wasserinhaltsstoffen ist die Bestimmung ihrer Wirkung auf Lebewesen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration entscheidend. Mithilfe von Zytotoxizitätstests können Aussagen über die toxische Wirkung von Wasserproben und trinkwasserrelevanten Reinstoffen auf die eingesetzten Gewebekulturen getroffen werden. Die Zellkulturen repräsentieren hierbei jeweils das Organ, dem sie entstammen.

Auf zellulärer Ebene beeinflussen Fremdstoffe lebensnotwendige Prozesse. Um die toxische Wirkung eines Fremdstoffes zu messen, wird außer der Vitalität/Mortalität durch den Nachweis lebender und toter Zellen, auch die Konzentration von zelleigenen Stoffen untersucht, die Veränderungen von Zellprozessen anzeigen. Damit ist es möglich differenziertere Aussagen zur Wirkung des Fremdstoffes zu treffen. Ein solches zelleigenes Molekül stellt das Glutathion (Abb. 1) dar.

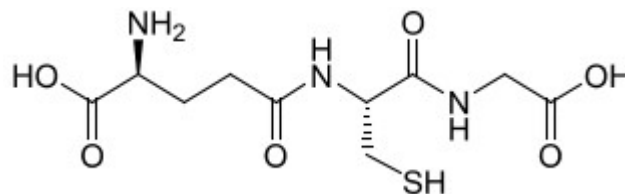


Abbildung 1: Strukturformel des Glutathion, GSH [URL 1]

Glutathion (GSH) dient in höheren Organismen zur Ausscheidung bzw. zum Abbau von Schadstoffen. Für die Ausscheidung von reaktiven elektrophilen Stoffwechselprodukten, die auch durch die Wirkung von Schadstoffen entstehen können, werden mithilfe der Glutathion-S-Transferasen an Glutathion-Moleküle konjugiert. Das Addukt ist nun wasserlöslicher und kann somit besser aus dem Organismus ausgeschieden werden [Fent; 2003]. Beim Abbau von Schadstoffen entgiftet Glutathion die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffradikale (ROS) und wird selbst zum Glutathion-Disulfid (GSSG, Abb. 2) oxidiert.

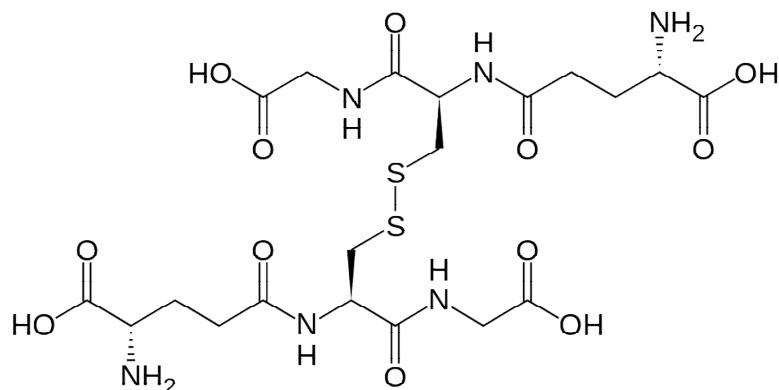


Abbildung 2: Strukturformel des Glutathion Disulfid, GSSG [URL 2]

Zur Gruppe der ROS (Tab. 1) zählen neben freien Radikalen, wie z.B. das Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$), auch Anionen, wie z.B. das Superoxid-Anion (O_2^-) und Hydroperoxide (R-OOH), wie z.B. H_2O_2 .

Tabelle 1: Sauerstoff-Verbindungen der Gruppe der ROS

freie Sauerstoffradikale	nicht-radikalische reaktive Sauerstoff-Verbindungen
Superoxidradikalanion ($\bullet\text{O}_2^-$)	Superoxid- bzw. Hyperoxidanion (O_2^-)
Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$)	Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
Alkoxyradikal ($\bullet\text{OR}$)	Hydroperoxid (ROOH)
Perhydroxylradikal ($\bullet\text{OOH}$)	Ozon (O_3)
Peroxyradikal ($\bullet\text{OOR}$)	Hypochloritanion (OCl^-)
reaktive Stickstoffverbindungen (z.B. $\bullet\text{NO}$)	Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) aus angeregten Sauerstoffmolekülen

Diese ROS entstehen sowohl bei pathophysiologischen Zuständen (Schadstoffabbau) als auch in geringem Maße bei normalen physiologischen Prozessen (Zellatmung). Werden in der Zelle mehr ROS gebildet, als durch das intrazelluläre Glutathion entgiftet werden können, kommt es zum oxidativen Stress der Zelle. Die ROS greifen dann in der Zelle vermehrt vitale zelluläre Moleküle an, indem sie diese oxidieren. So kann es zum Beispiel bei Proteinen und Enzymen zur Beeinträchtigung bzw. zum Verlust ihrer Funktionen kommen. ROS können auch eine Schädigung der DNA (Abb. 3) verursachen [Marquard, Schäfer, 2004].

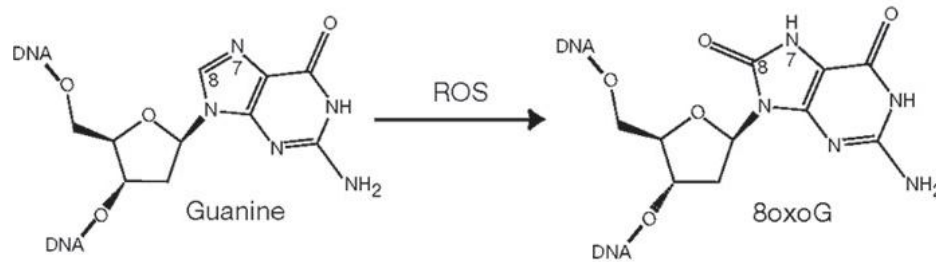


Abbildung 3: Schädigung der DNA durch ROS, links Guanosin, rechts 8-oxo-dG (7,8-Dihydro-8-oxo--deoxy-guanosin) [URL 3]

Oxidative Stress der Zellen ist dadurch gekennzeichnet, dass Glutathion überwiegend in seiner oxidierten Form (GSSG) vorliegt. Daher ist das Verhältnis $[GSH]:[GSSG]$ ein Maß für den oxidativen Stress und für die Schädigung eines Stoffes oder einer Wasserprobe.

Von Owens und Belcher [Owens, Belcher; 1965] wurde eine Methode zur Bestimmung des intrazellulären Gesamtglutathion-Gehaltes (GSH + GSSG) entwickelt. Hierbei wird zunächst GSSG mithilfe von Glutathion-Reduktase (GR) und unter Verbrauch von β -NADPH zu GSH reduziert (Abb. 4).



Abbildung 4: Umwandlung des GSSG in GSH durch Glutathion-Reduktase

Anschließend reagieren die GSH-Moleküle mit DTNB zum GS-TNB-Addukt (Abb. 5). Dabei wird ein TNB-Molekül freigesetzt. Das GS-TNB-Addukt wird durch die GR und unter β -NADPH-Verbrauch in GSH und ein zweites Molekül TNB gespalten. Die Anzahl der freigesetzten TNB-Moleküle ist proportional zur GSH- und GSSG-Konzentration.



Abbildung 5: enzymatische GSH-Nachweisreaktion mit DTNB (siehe auch [Rahman et al, 2007])

Insgesamt gelten folgende stöchiometrischen Verhältnisse:



Die gebildeten TNB-Moleküle sind kolorimetrisch bei 412 nm messbar und spiegeln den Gesamtglutathion-Gehalt der Zelle wieder.

Tietze [Tietze; 1969] entwickelte diese Methode weiter, hinsichtlich einer erhöhten Empfindlichkeit der Methode. Damit konnten auch die geringen Konzentrationen an GSSG (0,016 – 0,16 μM), wie sie normalerweise in den Zellen vorkommen, bestimmt werden. Weiterhin wurden, um zusätzlich zur Gesamtglutathion-Konzentration auch die Glutathion-Disulfid-Konzentration bestimmen zu können, reduziertes Glutathion mit NEM maskiert. So war es möglich aus dem Gesamtglutathion- und der Glutathion-Disulfid-Konzentration die Glutathion-Konzentration zu berechnen (Formel 1) und daraus das [GSH]:[GSSG]-Verhältnis zu bestimmen, das aussagekräftig für den Glutathionstatus der Zellen ist.

Formel 1: Berechnung der GSH-Konzentration

$$\text{GSH}_{\text{total}} = \text{GSH} + 2 * \text{GSSG}$$

In späteren Arbeiten wurde NEM zur Derivatisierung der Glutathion-Moleküle durch 2-Vinylpyridin (2-VP) ersetzt [Griffith, 1980; Mikasa et al, 1980]. Das NEM hatte den Nachteil, dass es nach der GSH-Maskierung aufwändig entfernt werden musste, da es die Glutathion-Reduktase inhibiert. Dieser zusätzliche Arbeitsschritt wurde durch 2-VP eliminiert, da dieses Reagenz nicht die Glutathion-Reduktase inhibiert und somit auch nicht entfernt werden muss [Griffith, 1980].

Heute werden auch kommerzielle Kits zur Messung der Gesamtglutathion- bzw. Glutathion-Disulfid-Konzentration angeboten. Die Vorteile dieser Kits liegen in der Eliminierung von Einflussfaktoren bei der Herstellung der Lösungen, sowie in einem geringeren Arbeits- und Zeitaufwand. Die Eignung des Kits für das jeweilige angestrebte Untersuchungsziel muss immer zuvor geprüft werden, während selbst eingearbeitete Untersuchungsmethoden an unterschiedliche Fragestellungen angepasst werden können.

Die Anwendung des „Glutathion-Recycling-Assay“ zur Beurteilung von trinkwasserrelevanten Stoffen und Wasserproben auf toxische Wirkungen erfordert die Integration der Methode in die bestehende Testbatterie zur Toxizitätstestung im Umweltbundesamt. Dazu ist die Anpassung der Methode an die in dieser Testbatterie eingesetzten Zellkulturen notwendig. Da Aussagen über mögliche Schadwirkungen auf den Menschen getroffen werden sollen, werden menschliche Zellen zur Testung verwendet, die ihren Ursprung in verschiedenen Organen hatten um organspezifische Wirkungen zu erfassen.

In der bestehenden Testbatterie werden gegenwärtig unter anderem Jurkat- und HEP G2-Zellen eingesetzt. An diesen beiden Zelllinien sind bereits Untersuchungen zum oxidativen Stress bekannt [Gul et al, 2001; Freeman et al, 1993].

Die Analysenmethode soll nach der Einarbeitung in der Lage sein, aussagekräftige Ergebnisse über den Glutathionspiegel in schadstoffbelasteten Zellkulturen zu liefern. Dabei soll zwischen verringertem und unverändertem [GSH]:[GSSG]-Verhältnis unterschieden werden. Diese Einteilung gibt Auskunft, ob die untersuchte Substanz bzw. Probe oxidativen Stress in den verwendeten Zellkulturen induziert (verringertes [GSH]:[GSSG]-Verhältnis) oder nicht (unverändert).

Für die Untersuchung ist es daher notwendig, sowohl eine unbelastete Probe, die den Effekt „keinen oxidativen Stress induzierend“ widerspiegelt („Negativkontrolle“), als auch eine mit einer „oxidativen Stress induzierenden“ Substanz belastete Probe („Positivkontrolle“) mit zu messen. Weiterhin muss das entsprechende Lösungsmittel auf eine „oxidativen Stress induzierenden“ Wirkung zusätzlich bestimmt werden. Deshalb werden bei jedem Testansatz folgende Proben bestimmt:

- eine unbelastete Probe („Negativkontrolle“, besteht nur aus Zellkultur)
- eine Zellkultur, die mit einer Substanz belastet wurde, die eine starke „oxidativen Stress induzierende“ Wirkung aufweist („Positivkontrolle“)
- eine Zellkultur, die mit der zu untersuchenden Testprobe (Reinsubstanz in Lösungsmittel oder Wasserprobe) belastet ist
- eine nur mit dem verwendeten Lösungsmittel der Testprobe belastete Probe (Lösungsmittelprobe)

Als Substanz für die Positivkontrolle wurde bereits in früheren Untersuchungen des Glutathionsystems von HEP G2-Zellen *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP, Abb. 6) verwendet [Casey et al., 1994; Griffith, 1999].

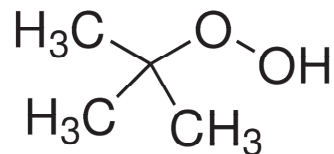


Abbildung 6: Strukturformel von *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) [URL 5]

Da TBHP ein Hydroperoxid ist, reagiert es als starkes Oxidationsmittel mit GSH zu GSSG [URL 4].

Eine weitere Substanz, die als Positivkontrolle verwendet werden kann, ist das DL-Buthionin-(S,R)-Sulfoximin (BSO, Abb. 7). Seine Wirkung unterscheidet sich von der des TBHPs, indem es nicht das GSH verbraucht, sondern seine Bildung verhindert.

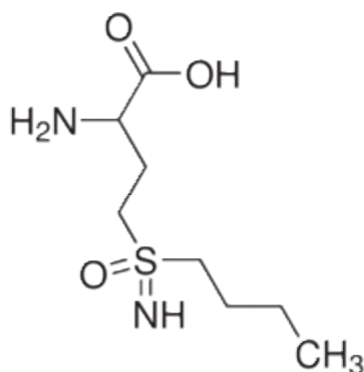


Abbildung 7: Strukturformel von DL-Buthionin-(S,R)-Sulfoximin [URL 6]

Die γ -Glutamylcysteinsynthetase hemmende Wirkung von BSO wurde bereits 1979 durch Griffith und Meister [Griffith, Meister, 1979] beschrieben. Das BSO wird mit Phosphorylasen in seine aktive Form, mit einer S-Alkyl-Einheit umgewandelt. Dieses aktivierte BSO blockiert nun das aktive Zentrum der γ -Glutamylcysteinsynthetase (allosterische Hemmung), sodass das ursprüngliche Akzeptormolekül Cystein nicht mehr daran binden kann. Da die γ -Glutamylcysteinsynthetase den ersten Schritt der Glutathion-Synthese katalysiert, wird durch die Inhibierung der γ -Glutamylcysteinsynthetase die gesamte Glutathion-Synthese gehemmt [Griffith, 1982; Griffith, 1999; Stock, 2005; Broquist, 2009].

Wie das TBHP wurde auch das BSO bereits in Untersuchungen des Glutathionspiegels von HEP G2-Zellen eingesetzt [Freeman et al., 1993; Casey et al., 1994]. Sein Vorteil liegt in der hohen Spezifität und sehr geringen Toxizität.

2 Zielstellung

In Zukunft soll der „Glutathion-Recycling-Assay“ in die Testbatterie zur Toxizitätstestung im Umweltbundesamt aufgenommen werden. Dabei sollen vergleichende Untersuchungen an menschlichen Zellkulturen mit Ursprung in unterschiedlichen Organen erfolgen. Als Zellkulturen werden deshalb eine Suspensionszelllinie (Blutzellen, Jurkat) und eine adhärenzte Zelllinie (Leberzellen, HEP G2) eingesetzt. Dabei soll das Testverfahren hinsichtlich folgender Punkte untersucht werden:

- Optimierung der einzusetzenden Zellzahl und des Messzeitpunktes für eine Endpunktmessung anhand der Jurkat-Suspensionskultur und der adhärenzten HEP G2-Zellkultur
- Eignung der Bestimmung des Proteingehaltes der Zellen als Bezugsgröße zur gemessenen Gesamtglutathion- bzw. Glutathion-Disulfid-Konzentration
- Untersuchung der Eignung von TBHP und BSO zur Positivkontrolle bei Einsatz von Jurkat- und HEP G2-Zellen
- Untersuchung statistischer Parameter zur Methodenvalidierung

3 Material

Für die Versuche zur Untersuchung des „Glutathion-Recycling-Assay“ wurden folgende Materialien verwendet.

3.1 Reagenzien

β-NADPH:	(Artikel-Nr.: N-7505-25 MG; Sigma, Steinheim)
2-Vinylpyridin:	(Artikel-Nr.: 132292; Aldrich, Steinheim)
absolutes Ethanol	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur (Merck, Darmstadt)
Bradford Reagenz:	Roti®-Quant (Artikel-Nr.: KO15.1; Roth, Karlsruhe), Bestimmungsgrenze 20 - 100 µg Protein
BSA (aus Kälberserum):	Bovine Serum Albumin (Artikel-Nr.: 8076.3; Roth)
BSO:	DL-Buthionine-(<i>S,R</i>)-sulfoximine (Artikel-Nr.: B2515-500MG; Sigma)
CASYton:	Verdünnungslösung für Zellkulturen (Artikel-Nr.: 43001; Innovartis)
Dikaliumhydrogenphosphat	(Artikel-Nr.: P 749.1; Roth)
DTNB:	(Artikel-Nr.: D-8130; Sigma)
EDTA:	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Artikel-Nr.: 8043.3; Roth)
FCS:	Foetal Calf Serum (Artikel-Nr.: F7524; Lot: 059K3395; Sigma)
Glutamin:	L-Glutamine (200 mM) (Lot: RNBC1002; Sigma)
Glutathion (oxidiert):	(Artikel-Nr.: G- 6654-50 MG; Sigma)
Glutathion (reduziert):	(Artikel-Nr.: G- 4251-5G; Sigma)
Glutathion-Reduktase:	500 U (Artikel-Nr.: G-3664; Sigma)
Kaliumdihydrogenphosphat:	(Artikel-Nr.: 3904.2; Roth)
NaOH:	0,2 N Natriumhydroxid (Artikel-Nr.: N074.1; Roth)
CMF-PBS:	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Lot: RNBB6303; Sigma)
RPMI-1640:	(Lot: RNBB9628; Sigma)
Sulfosalizylsäure:	(Lot: 080M0251V; Sigma)
TBHP:	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid-Lösung (7,78 M) entnommen aus

	Image-iT TM LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (Lot: 1030163; invitrogen TM)
Triethanolamin:	(Artikel-Nr.: T 58300; Sigma)
Triton X-100:	(Lot: 089K01921; Sigma)
Trypsin:	Trypsin (0,25%) - EDTA - Lösung (Lot: 11G620; Sigma)

3.2 Lösungen

Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung:	8,5 g K ₂ HPO ₄ 500 ml entionisiertes Wasser
Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung:	6,8 g KH ₂ PO ₄ 500 ml entionisiertes Wasser
KPE-Puffer:	16 ml Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung 84 ml Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung 0,327 g EDTA pH 7,5 einstellen mit 1 N HCl bzw. 1 N NaOH
Extraktionspuffer:	20 µl Triton X-100 120 mg Sulfosalizylsäure 20 ml KPE-Puffer
β-NADPH-Lösung:	3 mg β-NADPH 4,5 ml KPE-Puffer
DTNB-Lösung:	3 mg DTNB 4,5 ml KPE-Puffer
Glutathion-Reduktase-Lösung:	30 µl Glutathion-Reduktase 4,5 ml KPE-Puffer
DTNB-Glutathion-Reduktase-Lösung:	4,5 ml DTNB-Lösung 4,5 ml Glutathion-Reduktase-Lösung
Triethanolamin-Lösung:	15 µl Triethanolamin 75 µl KPE-Puffer
2-Vinylpyridin-Lösung:	20 µl 2-Vinylpyridin 80 µl absolutes Ethanol
GSH-Kalibrierkurvenlösungen:	
GSH-Stammlösung:	1 mg reduziertes Glutathion in 1 ml KPE-Puffer gelöst
GSH-Gebrauchslösung:	10 µl der GSH-Stammlösung

990 µl KPE-Puffer

Verdünnung 1 ($26,4 \mu\text{M} = 26,4 \mu\text{N}$):

800 µl GSH-Gebrauchslösung

200 µl KPE-Puffer

Verdünnung 2-9 ($13,2-0,103 \mu\text{N}$): Herstellung mithilfe einer 1:2

Verdünnungsreihe (500 µl der vorherigen

Verdünnung + 500 µl KPE-Puffer)

GSSG-Kalibrierkurvenlösungen:

GSSG-Stammlösung: 2 mg oxidiertes Glutathion in 1 ml KPE-Puffer gelöst

GSSG-Gebrauchslösung: 5 µl der GSSG-Stammlösung

995 µl KPE-Puffer

Verdünnung 1 ($13,2 \mu\text{M} = 26,4 \mu\text{N}$):

Die Normalität von GSSG und GSH bezieht sich auf GSH: $1 \text{ GSSG} \rightarrow 2 \text{ GSH}$

800 µl GSSG-Gebrauchslösung

200 µl KPE-Puffer

Verdünnung 2-9 ($13,2-0,103 \mu\text{N}$): Herstellung mithilfe einer 1:2

Verdünnungsreihe (500 µl der vorherigen

Verdünnung + 500 µl KPE-Puffer)

Bradford-Lösung (1:5 verdünnt): 4 ml Bradford-Reagenz

16 ml entionisiertes Wasser

Mit CORNING® 431154 - Filtereinheit filtrieren

Protein-Kalibrierkurvenlösungen:

BSA-Stammlösung ($10\,000 \mu\text{g/ml}$): 0,1 g BSA in 10 ml NaOH (0,2 N)
gelöst

BSA-Gebrauchslösung ($1000 \mu\text{g/ml}$): 100 µl BSA-Stammlösung
900 µl NaOH (0,2 N)

Verdünnung 1-8 ($500 - 4 \mu\text{g/ml}$): Herstellung mithilfe einer 1:2
Verdünnungsreihe (500 µl der
vorherigen Verdünnung + 500 µl
NaOH (0,2 N))

BSO-Stammlösung: 8,9 mg BSO

10 ml destilliertes Wasser

3.3 Zellkulturen

Kultur-Medium für HEP G2- und Jurkat-Zellen: RPMI-1640
10 % FCS
1 % Glutamin

Jurkat-Zelllinie

Die in Suspension wachsenden Leukämie-T-Zellen wurden aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen. Die Zelllinie wurde 1976 aus einer Blutprobe eines 14-jährigen Jungen erhalten. Ihre Verdopplungszeit beträgt 25 - 35 Stunden [URL 7].

HEP G2-Zelllinie

Die adhärente Leberkarzinom-Zelllinie wurde aus der DSMZ in Braunschweig bezogen. Sie wurde 1975 aus dem Tumor-Gewebe eines 15-jährigen Jungen entnommen. Die HEP G2-Zellen sind in der Lage eine Vielzahl an Leberenzymen zu exprimieren. Ihre Verdopplungszeit liegt bei 50 - 60 Stunden [URL 8].

3.4 Material

96-well Flachboden-Mikrotiterplatte: BRANDplates® (Lot: 359298; BRAND GmbH & Co. KG)
24-well Flachboden-Mikrotiterplatte: CELLSTAR® (Lot: E11090KT; Greiner Bio-One GmbH)
Filtereinheit für Proteinbestimmung: CORNING® 431154, 150 ml Filter System, 22 µm Cellulose Acetat (Corning Incorporated, USA)

3.5 Geräte

Zellzählgerät: CASY[®]1 (Cell Counter + Analyser System, Modell TT; Schärfe System, Reutlingen)

Plattenphotometer: Biochrom Anthos Zenyth 200rt Microplate Reader,
Software: ADAP Basic PC Software (Produkt Nr.: 12570001;
Biochrom Ltd., Cambridge)

Spectra Rainbow, Software Easy win (Tecan; Crailsheim)

4 Methoden

Die Methode zur Beurteilung der Toxizität von Substanzen mit Hilfe des „Glutathion-Recycling-Assay“ erfordert ein definiertes Verfahren zur Einsaat, Belastung und Aufbereitung der Zellen, die für die Analyse verwendet werden. Erst dann kann mit dem „Glutathion-Recycling-Assay“ die Bestimmung von GSH und GSSG erfolgen. Die Methodenerarbeitung umfasst deshalb alle Teilschritte von der Zelleinsaat bis zur Messung der GSH_{total}- und GSSG-Konzentration.

4.1 Einsaat und Belastung der Zellen

4.1.1 für Suspensionskulturen (Jurkat)

Zunächst wird die Zellkonzentration der Jurkat-Suspensionskultur mit dem Zellzählgerät (CASY[®]1, Schärfe System) bestimmt und daraus die notwendige Verdünnung mit Nährmedium so berechnet, dass eine Zellsuspension mit der gewünschten Anzahl von Zellen hergestellt werden kann. Von der Zellsuspension mit definierter Zellzahl werden nun jeweils 1,5 ml je well in eine 24-well-Flachbodenplatte eingesät. Zu den Zellsuspensionen werden nach einem vorab erstellten Belegungsplan die entsprechenden Substanzen zur Belastung (Positivkontrolle, Negativkontrolle, Testprobe, Lösungsmittelkontrolle) zugegeben, wobei alle wells dasselbe Volumen aufweisen. Die 24-well-Flachbodenplatte wird anschließend für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Dabei wird das zur Positivkontrolle verwendete BSO bereits bei der Einsaat zugegeben (Expositionsdauer: 24 h), während TBHP erst 2 Stunden vor Ende der Inkubation zugesetzt wird (Expositionsdauer: 2 h).

4.1.2 für adhärente Zellkulturen (HEP G2)

Da adhärente Zellen direkt an der Oberfläche der Zellkulturflasche haften, müssen die HEP G2-Zellen zuerst durch trypsinieren in Suspension gebracht werden. Dazu wird das Kulturmedium abgesaugt und die HEP G2-Zellen einmal mit PBS (ohne Mg²⁺ und ohne Ca²⁺), zum Entfernen von Medium-Resten, durch Überschichten gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit Trypsin für 30 s überschichtet. Nachdem das Trypsin abgesaugt wurde, wird die Zellkulturflasche für ca. 5 min bei 37 °C und 5 %

CO₂ inkubiert. Zuletzt werden die Zellen in dem benötigten Volumen an Medium resuspendiert.

Als nächstes wird wie bei Suspensionskulturen (vgl. Abschnitt 4.1.1) die benötigte Zellzahl für die Einsaat anhand der mit dem Zellzählgerät CASY[®]1 gemessenen Konzentration eingestellt. Von der so angefertigten Suspension werden jeweils 1,5 ml je well in eine 24-well-Flachbodenplatte eingesät und für 3 Stunden zum Adhäreren inkubiert (37 °C, 5 % CO₂).

Anschließend werden wie bei der Suspensionskultur die entsprechenden Substanzen zur Belastung zugegeben und die Platte wird unter den gleichen Bedingungen wie bei der Suspensionskultur inkubiert (24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂).

Dabei wird auch hier das zur Positivkontrolle verwendete BSO bereits bei der Einsaat zugegeben (Expositionsdauer: 24 h), während TBHP erst 2 Stunden vor Ende der Inkubation zugesetzt wird (Expositionsdauer: 2 h).

4.2 Zellaufbereitung

Die Zellaufbereitung dient dazu, GSH und GSSG aus den Zellen freizusetzen und in die Lösung zu überführen. Die GSH- und GSSG-haltigen Lösungen können dann unabhängig von der eingesetzten Zelllinie weiter analysiert werden.

4.2.1 für Suspensionskulturen (Jurkat)

Nach der Belastung werden die Zellsuspensionslösungen in Mikroreaktionsgefäße überführt und bei 95 x g zentrifugiert (5 min, 4 °C). Anschließend werden die Überstände verworfen und zu jedem Pellet 1 ml CMF-PBS zugegeben. Es wird erneut zentrifugiert und der entstehende Überstand verworfen. Das Pellet wird wieder in 1 ml CMF-PBS resuspendiert. Nach den Waschschritten wird für die Proteinbestimmung pro Lösung ein Aliquot von 100 µl abgenommen.

Danach wird die restliche Lösung erneut zentrifugiert (95 x g, 5 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml kaltem Extraktionspuffer aufgenommen. Die Lösungen werden für fünf Minuten mit Ultraschall (Ultraschallbad, 160 Watt) behandelt, wobei im Abstand von ca. 30 s mit dem Vortex gemischt wird. Des Weiteren

werden die Proben zweimal eingefroren (15 min, -80 °C oder 30 min, -20 °C) und wieder aufgetaut. Abschließend werden die Lösungen bei 13200 x g (5 min, 4 °C) zentrifugiert und je Probe zwei 100 µl-Aliquots (eines zur GSH_{total}- und eines zur GSSG-Messung) entnommen. Die erhaltenen 100 µl-Proben werden bei -80 °C oder -20 °C bis zur Messung gelagert.

4.2.2 für adhärente Zellkulturen (HEP G2)

Für adhärente Zelllinien ist es notwendig die Zellen zunächst zu trypsinieren. Dazu werden die Zellen zuerst mit CMF-PBS überschichtet. Die Waschlösung wird anschließend wieder abgesaugt. Dieser Waschschrift wird noch einmal wiederholt und danach werden die Zellen mit Trypsin überschichtet. Nach 5 min Einwirkzeit bei 37 °C wird das Trypsin wieder entfernt und die Zellen in 1 ml Nährmedium resuspendiert.

Die entstandenen Zellsuspensionen werden in Mikroreaktionsgefäße überführt und wie in Abschnitt 4.2.1 für Suspensionskulturen beschrieben weiter behandelt.

4.2.3 Bestimmung einer Bezugsgröße für die GSH_{total}- und GSSG-Konzentration

Da die Glutathion-Konzentration mit der Zellzahl variiert, muss eine Bezugsgröße zur Glutathion-Konzentration bestimmt werden. Dazu kann die Zellkonzentration der eingesäten Zellen vor Inkubation (Belastungsdauer) oder die Proteinkonzentration der Zellen nach 24-stündiger Inkubation gemessen werden. Die Zellkonzentration wurde mit dem Zellzählgerät CASY[®]1 bestimmt (siehe Abschnitt 4.1).

Die Proteinbestimmung nach Bradford [Bradford, 1976] erfolgt mithilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue-G250. Dieser Farbstoff reagiert mit den kationischen und unpolaren Protein-Seitenketten und bildet einen Farbstoff-Protein-Komplex. Während der Reaktion verschiebt sich das Adsorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm. Die Proteinkonzentration wird daher durch Messung der Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt.

Da Coomassie-Blue nur mit bestimmten Protein-Seitenketten reagiert, ist die Nachweisreaktion von der Art des Proteins abhängig, daher ist die Anfertigung einer Kalibrierkurve für jedes Proteingemisch notwendig. Für unbekannte Proteingemische (Zelllysate), wie sie in diesem Fall gemessen werden sollen, hat sich BSA (Rinder-

Serum-Albumin) als Proteinstandard international etabliert [URL 9] und wird daher auch hier verwendet. Für die praktische Durchführung wurde eine institutsinterne Anleitung [Heinze, 2012] verwendet.

Dabei werden zuerst die 100 µl-Aliquots der Proben bei 95 x g für 5 min zentrifugiert und 80 µl des Überstandes verworfen. 20 µl müssen als Rest-Überstand bleiben, da das Pellet sehr instabil ist. Je Mikroreaktionsgefäß werden 150 µl 0,2 N NaOH-Lösung zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur und gelegentlichem Mischen mit einem Vortex inkubiert. 50 µl der lysierten Zellen und der Protein-Kalibrierlösungen werden pro well in eine 96-well-Flachbodenplatte übertragen und 200 µl der Bradford-Lösung zugegeben. Zuletzt werden die Lösungen 10 min bei Raumtemperatur und unter Schütteln inkubiert und anschließend die Extinktion mit dem Plattenphotometer - Spectra Rainbow bei 592 nm gemessen.

4.3 GSH_{total}-Messung

Der Ablauf der GSH_{total}-Bestimmung für adhärenzte und Suspensionskulturen erfolgt analog.

Zur Bestimmung des GSH_{total}-Gehaltes werden zunächst 20 µl der Proben, der Lösungen für die Kalibrierkurven (0,103 bis 26,4 µN GSH in KPE-Puffer) und des Blanks (KPE-Puffer) in eine 96-well-Flachbodenplatte einpipettiert (jeweils Doppelbestimmung). Es wird ein Gemisch aus 4,5 ml DTNB-Lösung und 4,5 ml Glutathion-Reduktase-Lösung vorbereitet. Anschließend werden 120 µl dieses Gemisches zu jedem well hinzugefügt. Nach 30 s werden zur Initialisierung der Recycling-Reaktion 60 µl β-NADPH je well zugegeben. Nach einer definierten Zeitdauer wird mithilfe des Plattenphotometers – Anthos zenyth die Extinktion der Lösungen gemessen.

4.4 GSSG-Messung

Bei der GSSG-Bestimmung werden zunächst je 100 µl des KPE-Puffers (Blank), der Kalibrierkurvenlösungen (0,103 - 26,4 µN GSSG) und der zu untersuchenden Proben in 1,5 ml Glasgefäße übertragen. Zu jedem Fläschchen wird 2 µl 2-Vinylpyridinlösung gegeben und kräftig mit einem Vortex gemischt. Die Lösungen müssen anschließend eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur reagieren. Als nächstes

wird die bei der Zellaufbereitung zugegebene Säure (Sulfosalizylsäure im Extraktionspuffer enthalten, siehe 4.2.1 und 4.2.2), durch die Zugabe von 6 µl Triethanolaminlösung (TEA-Lösung) neutralisiert. Nach 10 min können 20 µl je Lösungen (in Doppelbestimmung) in eine 96-well-Flachbodenplatte übertragen werden.

Im Anschluss werden 120 µl des DTNB-Glutathion-Reduktase-Gemisches zu jedem well gegeben und es wird wie in Abschnitt 4.3 bei der GSH-Bestimmung beschrieben weiter verfahren.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Methode des enzymatischen „Glutathion-Recycling-Assay“ ist seit langem bekannt u.a. [Griffith, 1980] und ist im Umweltbundesamt in einer institutsinternen Anleitung beschrieben. [Heinze, 2012]. Für eine Aufnahme der Methode in die Testbatterie zur Toxizitätsbewertung von trinkwasserrelevanten Substanzen und Wasserproben müssen jedoch einzelne Teilschritte und Parameter noch optimiert und die Messergebnisse validiert werden.

5.1 Messzeitpunktoptimierung

Bei der Durchführung des „Glutathion-Recycling-Assay“ wird während der Kreislauf-Reaktion TNB gebildet, das dann photometrisch bestimmt wird. Die Bildung des TNB beginnt mit der Zugabe des vollständigen Reaktionsgemisches aus DTNB, Glutathion-Reduktase und β -NADPH zu den Probelösungen. Die Konzentration des TNBs nimmt deshalb sowohl mit der GSH-bzw. GSSG-Konzentration in der Ausgangsprobe als auch mit der Zeit nach der Zugabe des Reaktionsgemisches zu. Aus diesem Grund steigt der Extinktionswert, je später die Messung erfolgt.

Da das bei der GSSG-Bestimmung eingesetzte 2-VP die Bildung des TNBs und somit das Ansteigen des Extinktionswertes verlangsamt [URL 10], muss der optimale Messzeitpunkt sowohl für die $\text{GSH}_{\text{total}}$ - als auch für die GSSG-Bestimmung separat ermittelt werden.

Als Kriterien für den optimalen Messzeitpunkt dienen die Empfindlichkeit sowie der Messbereich der Konzentrationsbestimmung. Hierfür muss der Extinktionswert für einen möglichst großen Teil des erwarteten Konzentrationsbereiches für $\text{GSH}_{\text{total}}$ und GSSG (0 – 26 μN) im Messbereich des verwendeten Photometers liegen.

Dieser Konzentrationsbereich umfasst für GSH den Bereich von 0 – 26 μM und für GSSG den Bereich von 0 – 13 μM . Da jeweils 1 GSSG zu 2 GSH reagiert, wird als Konzentrationsangabe die Normalität benutzt. 1 N bedeutet hier, dass die Lösung 1 mol/l GSH enthält oder dass sich darin 1 mol/l GSH bilden kann.

Außerdem soll die Empfindlichkeit der Analyse möglichst groß sein, d.h. kleine Konzentrationsänderungen sollen große Änderungen im Messwert (Extinktion) bewirken.

Deshalb wurde der „Glutathion-Recycling-Assay“ mit Lösungen für die Kalibrierung mit bekannten Konzentrationen an GSH bzw. GSSG im Bereich von 0 bis 26 μN durchgeführt und die Extinktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe des Reaktionsgemisches gemessen.

Nach diesem Vorgehen wurde der optimale Messzeitpunkt der $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Messung bereits in vorangegangenen Untersuchungen [Nancke, 2012] anhand einer Versuchsreihe abgeschätzt. In dieser Arbeit wurde mit weiteren vier Messreihen, jeweils für $\text{GSH}_{\text{total}}$ und GSSG, mit den Messzeitpunkten 5, 10, 15, 20, 25 und 30 min untersucht.

Hierfür wurden die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen bei jeweils gleicher Konzentration aus den verschiedenen Messreihen gebildet. Diese Mittelwerte wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen der Kalibrierlösungen für die unterschiedlichen Messzeitpunkte aufgetragen (Abb. 8 und 9).

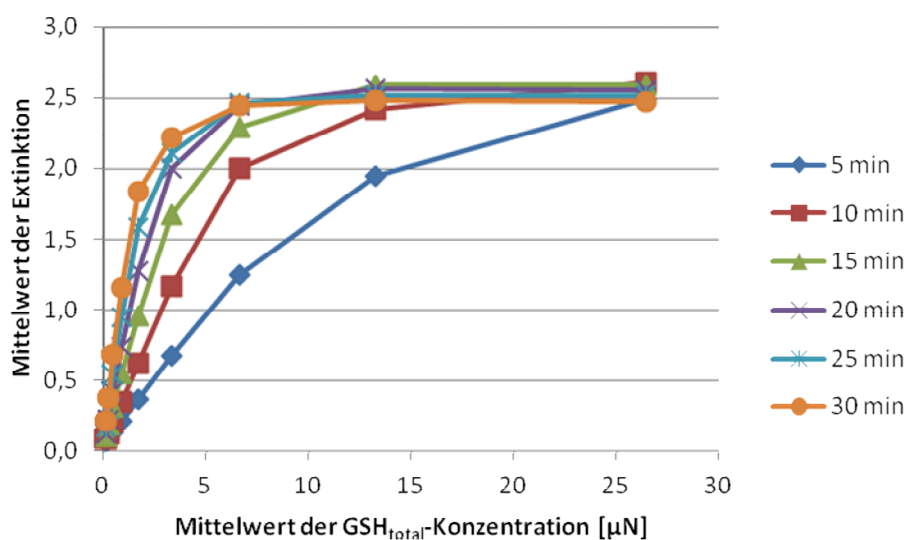


Abbildung 8: Kalibrierkurven für die $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Bestimmung zu unterschiedlichen Messzeitpunkten

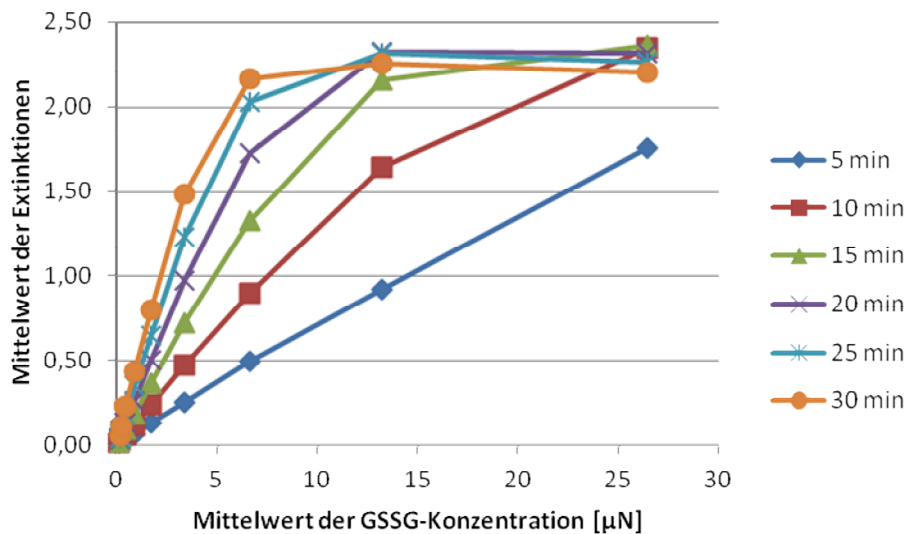


Abbildung 9: Kalibrierkurven für die GSSG-Bestimmung zu unterschiedlichen Messzeitpunkten

Die Kurven in Abbildung 8 und 9 stellen mögliche Kalibrierkurven für die $\text{GSH}_{\text{total}}$ - bzw. GSSG-Bestimmung dar. Wie erwartet sind die Extinktionswerte der GSSG-Messung bei gleichem Messzeitpunkt und bei vergleichbarer Konzentration geringer als die der $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Bestimmung.

Bei Extinktionswerten über 2 bleibt die Extinktion trotz wachsender $\text{GSH}_{\text{total}}$ - bzw. GSSG-Konzentration nahezu konstant. Hier wird der Messbereich des Photometers überschritten. Mit steigendem Messzeitpunkt sinkt deshalb die maximal messbare Konzentration und der Messbereich wird enger. (vgl. Tab. 2).

Auch im Anfangsbereich (Extinktion < 2) sind die Kurven in Abbildung 8 und 9 nur näherungsweise linear. Die Krümmung kann aus dem Verbrauch des Substrates (β -NADPH) resultieren. Für die Untersuchung der Empfindlichkeit und des Messbereiches wurden die Anfangsbereiche aller Kurven näherungsweise durch Geradengleichungen beschrieben und deren Anstieg bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der so bestimmte Anstieg der Kalibrierkurven (Abb. 8 und 9) umso größer ist, je später die Messung stattfand. Ein großer Anstieg bedeutet eine hohe Empfindlichkeit der Messung (Tab. 2), da auch kleine Konzentrationsänderungen noch nachgewiesen werden können. Demnach liefert die Kalibrierkurve nach 30 min die höchste und die Kalibrierkurve nach 5 min die niedrigste Empfindlichkeit.

Tabelle 2: Parameter der Messzeitpunkte für die GSH_{total}- und GSSG-Kalibrierkurven

Messzeitpunkt [min]	GSH _{total}		GSSG	
	Messbereich*	Empfindlichkeit**	Messbereich*	Empfindlichkeit**
5	0 – 13,2	0,16	0 – 26,4	0,07
10	0 – 3,3	0,36	0 – 13,2	0,13
15	0 – 3,3	0,53	0 – 6,6	0,21
20	0 – 1,65	0,81	0 – 6,6	0,27
25	0 – 1,65	1,02	0 – 3,3	0,38
30	0 – 1,65	1,21	0 – 3,3	0,46

* der Glutathionkonzentration [μN]

** [Anstieg der Extinktion pro μN Glutathionkonzentration]

Aus der Tabelle 2 ist ersichtlich, dass der optimale Messzeitpunkt nach dem jeweiligen Untersuchungsziel festgelegt werden muss, da eine große Empfindlichkeit mit einem kleinen Messbereich verbunden ist und umgekehrt.

Messbereich und Empfindlichkeit der GSH_{total}-Bestimmung unterscheiden sich für jeden Messzeitpunkt von den entsprechenden Parametern der GSSG-Bestimmung. Daher kann es je nach Fragestellung sinnvoll sein, für die GSH_{total}- und GSSG-Messung gegebenenfalls unterschiedliche Messzeitpunkte zu wählen.

Beim Einsatz von unterschiedlichen Zellzahlen und Zelllinien werden unterschiedliche GSH_{total}- bzw. GSSG-Konzentrationen erwartet. Deshalb muss der jeweilige Messzeitpunkt immer anhand der erwarteten Konzentration entsprechend Tabelle 2 gewählt werden.

5.2 Zellzahloptimierung

Die Zellzahl wird entsprechend Abschnitt 4.1 vor der Belastung eingestellt. Da die Zellzahl das Messergebnis beeinflusst, wurden Untersuchungen zur Festlegung der optimalen einzusetzenden Zellzahl jeweils für Jurkat- und für HEP G2-Zellen durchgeführt.

5.2.1 für Jurkat

Es wurden Zellkonzentrationen von $0,625 \times 10^5$ bis 4×10^6 Zellen/ml eingesetzt und der Glutathiongehalt gemessen (Tab. 3).

Tabelle 3: gemessene GSH_{total}- und GSSG-Konzentrationen für unterschiedliche Jurkat-Zellzahlen (Einsaat)

Zellzahl [10⁶ Zellen/ml]	GSH_{total} [μN]	GSSG [μN]	Anzahl der Messungen
4	9,3	2,5	3
2	8,0	2,3	3
1	5,9	1,9	3
0,5	3,9	1,5	3
0,25	1,9	1,3	3
0,125	1,3	1,2	2
0,0625	0,5	0,0	2

Zur Festlegung einer optimalen Zellzahl wurde als Bewertungskriterium die relative Standardabweichung der gemessenen Extinktionen jeweils aus unterschiedlichen Versuchen mit der gleichen eingesäten Zellzahl gewählt. Die Abhängigkeit der so ermittelten relativen Standardabweichung von der eingesäten Zellzahl ist in Abbildung 10 dargestellt.

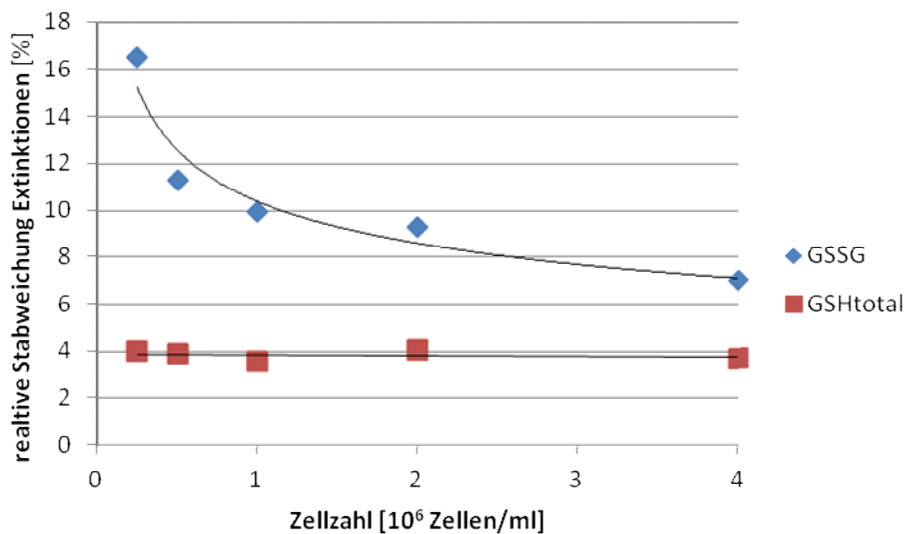


Abbildung 10: Abhängigkeit der relativen Standardabweichung von der eingesäten Jurkat-Zellzahl/ml

Bei Messungen des $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Gehaltes bleiben die relativen Standardabweichungen von $0,25 - 4 \times 10^6$ Zellen/ml konstant (Abb. 10). Bei den gemessenen GSSG-Konzentrationen ist die Standardabweichung höher als bei der $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Bestimmung und steigt für Zellzahlen $< 1 \times 10^6$ Zellen/ml mit sinkender Zellzahl stark an. Daraus ergibt sich, dass die Zellzahl mindestens 1×10^6 Zellen/ml betragen sollte.

Bei höheren Zellkonzentrationen muss aber auch mit Zellaggregation gerechnet werden. Aggregierte Zellen können je nach Lage im Aggregat vom Nährmedium abgeschnitten werden und verlieren somit ihre Nährstoffversorgung [URL 11]. Deshalb wurde der Aggregationsfaktor, der den Anteil an Zellhaufen in der Zellsuspension beschreibt, für einige Zellkonzentrationen mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY[®]1 bestimmt (Abb. 11).

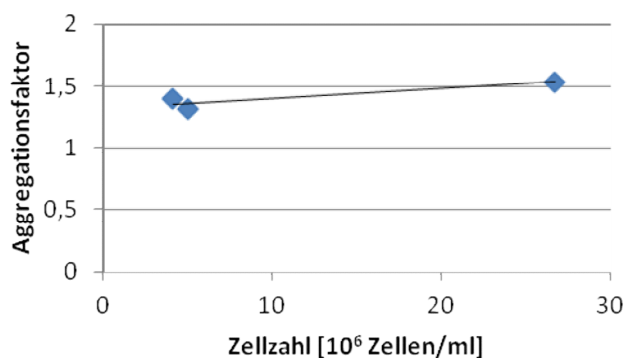


Abbildung 11: Abhängigkeit des Aggregationsfaktors von der Jurkat-Zellkonzentration

Es zeigte sich, dass der Aggregationsfaktor mit der eingesetzten Jurkat-Zellzahl steigt, aber für alle untersuchten Zellzahlen unter 2 bleibt. Aus diesem Grund ist die Verwendung aller untersuchten Zellzahlen möglich.

Bei der $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Bestimmung wurden zunächst aufgrund der Zellzahl-unabhängigen relativen Standardabweichung keine Einschränkungen für bestimmte Zellzahlbereiche getroffen. Hohe Zellzahlen verursachen aber auch hohe $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Konzentrationen und damit hohe Extinktionswerte, die an der Grenze oder außerhalb des Messbereiches des Photometers (Extinktion < 2) liegen können (Abb. 12). Dazu wurden Jurkat-Zellen mit Konzentrationen bis zu 1×10^7 Zellen/ml untersucht.

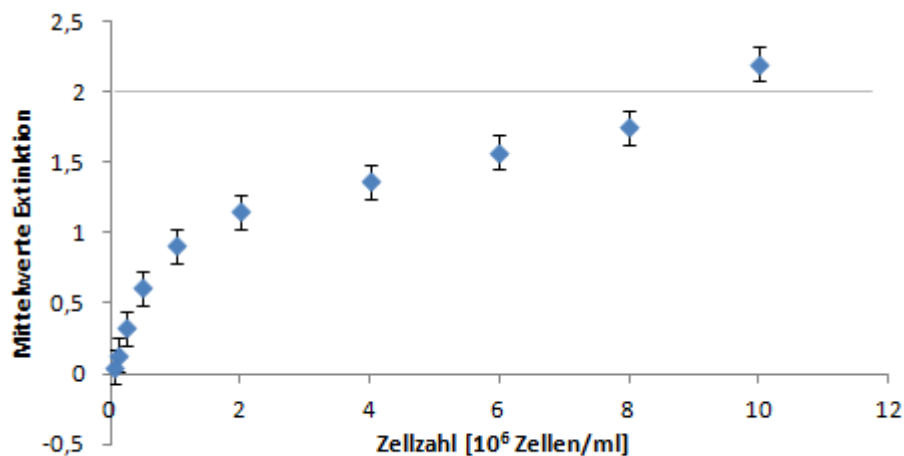


Abbildung 12: Abhängigkeit der gemessenen Extinktionen bei $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Messungen von der eingesetzten Jurkat-Zellzahl

Anhand der Abbildung 12 ist der einzusetzende Zellzahlbereich auf $< 1 \times 10^7$ Zellen/ml einzuschränken. Insgesamt ergibt sich daraus für die Jurkat-Zelllinie eine optimale einzusetzende Zellzahl von $1 - 8 \times 10^6$ Zellen/ml.

5.2.2 für HEP G2

Für HEP G2-Zellen wurden wie für die Jurkat-Zellen Konzentrationen von $0,625 \times 10^5$ bis 4×10^6 Zellen/ml eingesetzt und der Glutathiongehalt gemessen (Tab. 4).

Tabelle 4: gemessene GSH_{total}- und GSSG-Konzentrationen für unterschiedliche HEP G2-Zellzahlen (Einsaat)

Zellzahl [10 ⁶ Zellen/ml]	GSH _{total} [μN]	GSSG [μN]	Anzahl der Messungen
4	0,7	0,5	3
2	1,1	1,0	3
1	1,1	0,8	3
0,5	1,0	0,8	3
0,25	0,8	0,7	3
0,125	0,3	0,3	2
0,0625	0,7	0,5	2

Zur Festlegung einer optimalen Zellzahl wurde wie bei den Jurkat-Zellen als Bewertungskriterium die relative Standardabweichung der gemessenen Extinktionen jeweils aus unterschiedlichen Versuchen mit der gleichen eingesäten Zellzahl gewählt. Die Abhängigkeit der so ermittelten relativen Standardabweichung von der eingesäten Zellzahl ist in Abbildung 13 dargestellt.

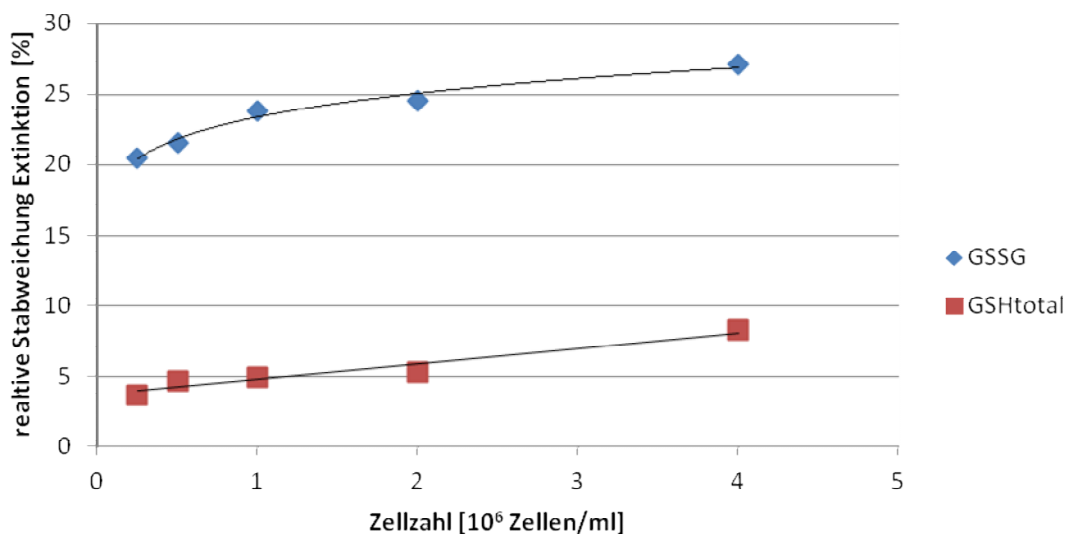


Abbildung 13: Abhängigkeit der relativen Standardabweichung von der eingesäten HEP G2-Zellzahl/ml

Die relativen Standardabweichungen der Extinktionswerte für GSH_{total}- und GSSG-Messungen bei den HEP G2-Zellen sind größer als die entsprechenden Werte für die Jurkat-Zellen und steigen mit wachsender Zellzahl. Daraus ergibt sich, dass die Zellzahl möglichst niedrig sein sollte.

Wie bei den Jurkat-Zellen wurde der Aggregationsfaktor für einige Zellkonzentrationen mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY®1 bestimmt (Abb. 14).

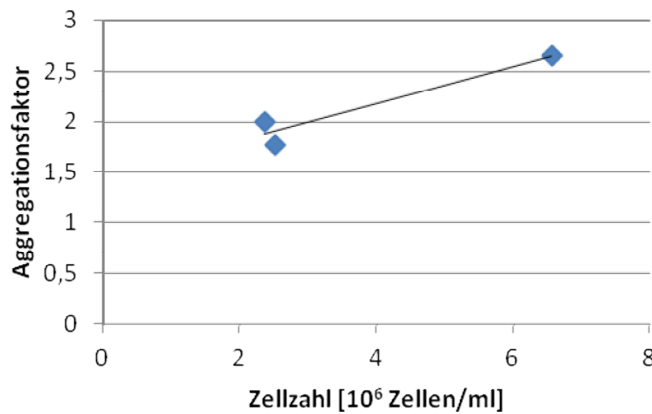


Abbildung 14: Abhängigkeit des Aggregationsfaktors von der HEP G2-Zellkonzentration

Bei den HEP G2-Zellen steigt der Aggregationsfaktor bereits bei Zellzahlen $> 2 \times 10^6$ Zellen/ml über 2 an und wächst für höhere Zellzahlen weiter. Dies erklärt das Verhalten der Standardabweichung in Abbildung 13, wenn man davon ausgeht, dass die Freisetzung von GSH bzw. GSSG aus den aggregierten Zellen ungleichmäßiger erfolgt als aus einer normalen Zellsuspension.

Außerdem wurde bei den HEP G2-Zellen wie auch schon bei den Jurkat-Zellen geprüft, ob die gemessenen Extinktionswerte im Messbereich des Photometers liegen (Abb. 15).

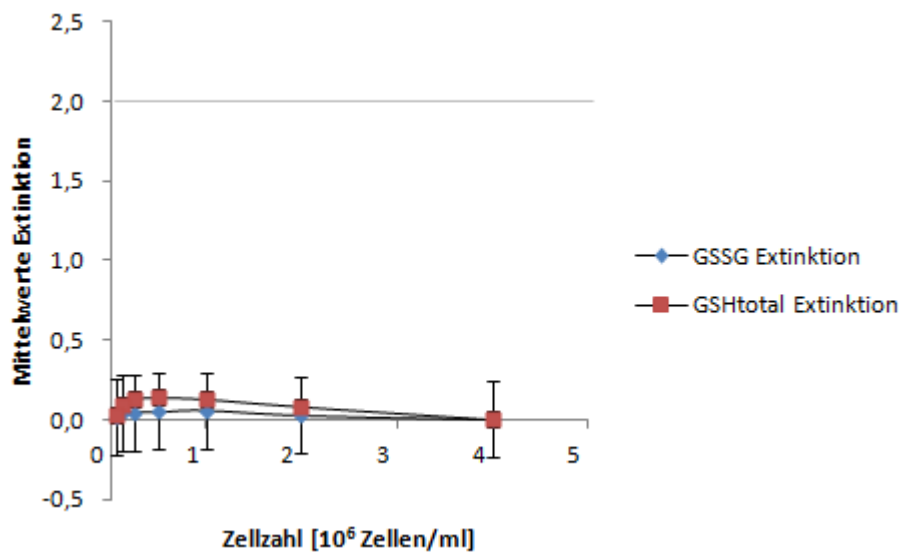


Abbildung 15: Abhängigkeit der gemessenen Extinktion bei $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Messungen von der eingesetzten HEP G2-Zellzahl

Für die HEP G2-Zellen sind die im untersuchten Zellzahlbereich gemessenen Extinktionswerte sehr niedrig. Die zugehörigen $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Konzentrationen (vgl. Tab. 4) sind dementsprechend so niedrig, dass sie unter der Bestimmungsgrenze der Methode liegen (vgl. Abschnitt 5.5.5).

Die optimale Zellzahl bei den HEP G2-Zellen sollte einerseits aufgrund der Zellaggregation so klein wie möglich gewählt werden ($< 2 \times 10^6$ Zellen/ml), andererseits liegen die bestimmten Konzentrationen bei allen Zellzahlen im Bereich von $0,0625 - 4 \times 10^6$ Zellen/ml unter der Bestimmungsgrenze der Methode. Deshalb muss für Messungen an den HEP G2-Zellen die Zellaggregation verhindert und die Zellaufbereitung noch weiter optimiert werden.

5.3 Proteinkonzentration und eingesäte Zellzahl als Bezugsgrößen für die Glutathionbestimmung

Um die beim „Glutathion-Recycling-Assay“ bestimmten $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG -Konzentrationen aus unterschiedlichen Messungen miteinander vergleichen zu können, müssen sie sich auf einheitliche Bezugsgrößen beziehen. Als Bezugsgröße für die Glutathionkonzentration kommen die eingesäte Zellanzahl vor der 24-stündigen Inkubation oder die Proteinbestimmung nach der Inkubationszeit (Belastungszeit) in Frage.

Die Eignung dieser beiden Bezugsgrößen für die Bewertung der $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG -Konzentrationen aus dem „Glutathion-Recycling-Assay“ soll für beide bisher verwendeten Zelllinien (Jurkat und HEP G2) geprüft werden.

5.3.1 Jurkat

In ersten Untersuchungen wurde zunächst das Verhältnis zwischen den beiden Größen (eingesäte Zellzahl und Proteinkonzentration) geprüft (Abb. 16). Hierfür wurden Jurkat-Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Zellzahlen entsprechend Abschnitt 4.1.1 ohne Schadstoffzugabe inkubiert und danach die Proteinkonzentration nach Bradford entsprechend Abschnitt 4.2.3 bestimmt.

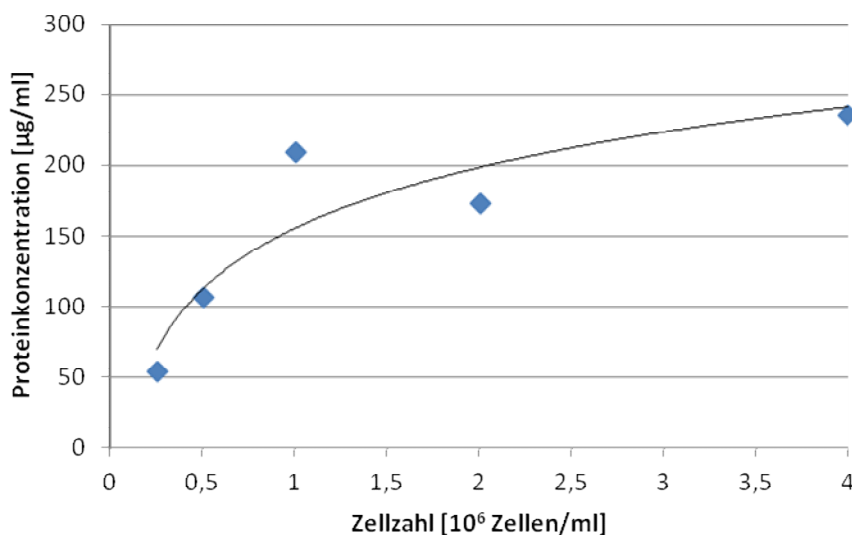


Abbildung 16: Abhängigkeit der Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation von der eingesäten Jurkat-Zellzahl

Es zeigte sich, dass die Proteinkonzentration zwar mit wachsender Zellzahl steigt, aber der Zusammenhang nicht linear ist. Erwartungsgemäß sollte jede Zelle einer Zelllinie ungefähr den gleichen Proteingehalt aufweisen, d.h. der Proteingehalt sollte proportional zur Zellzahl sein. Die Krümmung der Kurve weist darauf hin, dass die Änderung der Zellzahl während der Inkubation von der eingesetzten Zellzahl abhängig war – in Proben mit niedrigen Zellzahlen hat eine stärkere Zellteilung stattgefunden als in konzentrierteren Proben. Mit steigender Konzentration an Zellen in Zellkulturmedium sinkt das Verhältnis von verfügbarem Zellkulturmedium pro Zelle und somit auch die Wachstumsrate der Zellen.

Anschließend wurde mit Hilfe des „Glutathion-Recycling-Assay“ die $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Konzentrationen bestimmt und jeweils auf die eingesetzte Zellzahl bzw. den Proteingehalt nach der Inkubation bezogen (Abb. 17 und 18).

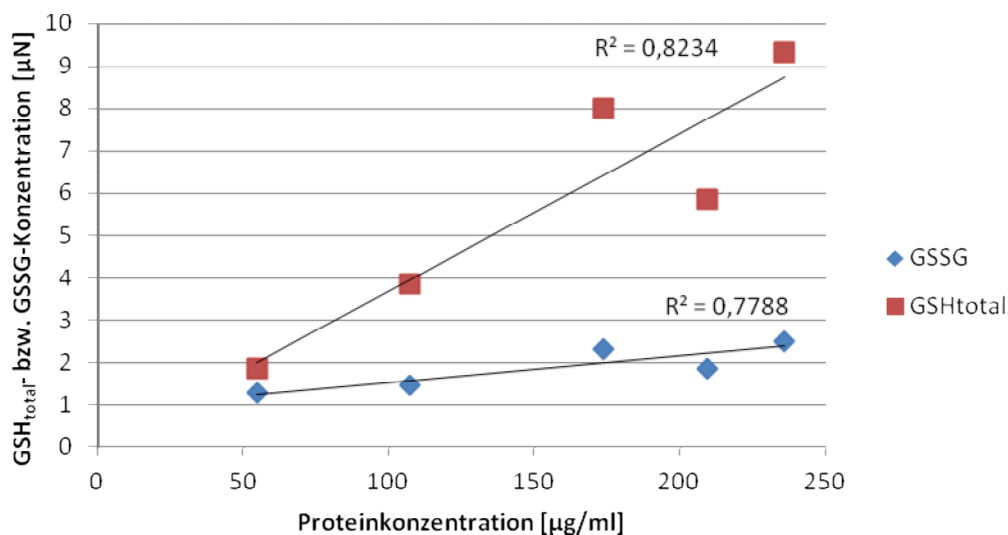


Abbildung 17: Abhängigkeit der $\text{GSH}_{\text{total}}$ - bzw. GSSG-Konzentration von der jeweiligen Proteinkonzentration

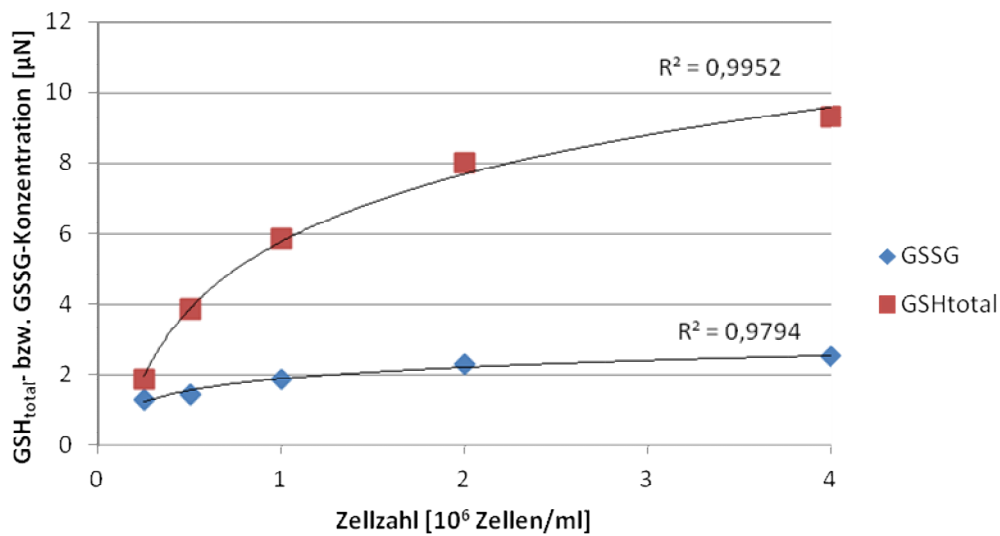


Abbildung 18: Abhängigkeit der GSH_{total}- bzw. GSSG-Konzentration von der eingesäten Jurkat-Zellzahl

Die erwartete lineare Abhängigkeit der bestimmten GSH_{total}- und GSSG-Konzentrationen von der Proteinkonzentration wurde gefunden. Die Abhängigkeit der GSH_{total}- und GSSG-Konzentrationen von der eingesäten Zellzahl war aufgrund der Abhängigkeit des Zellwachstums von der eingesetzten Zellkonzentration nicht linear.

Trotzdem können beide Bezugsgrößen für die Beurteilung der Messergebnisse des „Glutathion-Recycling-Assay“ als geeignet angesehen werden, sie erfordern nur eine entsprechende Darstellung der Zielstellung.

Bezieht man die bestimmten GSH_{total}- und GSSG-Konzentrationen auf die eingesetzte Zellzahl, erhält man Aussagen nicht nur über die Veränderung des Glutathionspiegels in den nach der Inkubation (noch) vorhandenen Zellen sondern auch über eine mögliche Hemmung der Zellvermehrung durch die Prüfsubstanz (Belastungsprobe). Durch die Kombination mit anderen Toxizitätstest der Testbatterie kann der Einfluss der Prüfsubstanz auf die Zellvermehrung abgeklärt werden. Wählt man die Proteinkonzentration als Bezugsgröße, erhält man nur Aussagen über den Glutathionspiegel in den nach der Inkubation (noch) vorhandenen Zellen.

5.3.2 HEP G2

Auch für HEP G2-Zellen wurde, wie bereits für die Jurkat-Zellen (vgl. Abschnitt 5.3.1) beschrieben, zunächst das Verhältnis zwischen der Proteinkonzentration und der eingesetzten Zellzahl geprüft (Abb. 19).

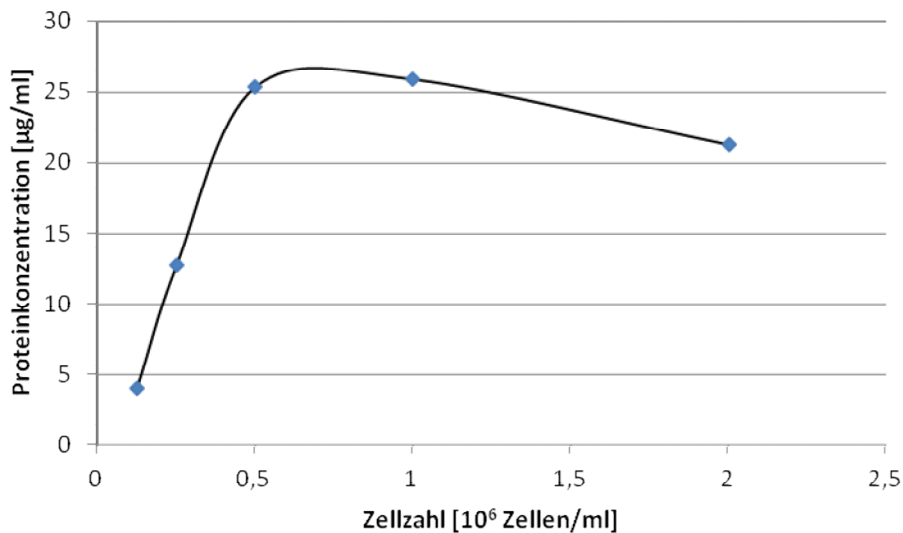


Abbildung 19: Abhängigkeit der Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation von der eingesäten HEP G2-Zellzahl

Auch bei den HEP G2-Zellen ist kein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Zellzahl und der Proteinbestimmung nach der Inkubation zu erkennen. Im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen steigt aber die Proteinkonzentration für Zellzahlen $> 0,5 \times 10^6$ Zellen/ml nicht weiter an. Die bestimmten Proteinkonzentrationen sind auch wesentlich kleiner als bei den Jurkat-Zellen. Dies weist auf ein geringes Zellwachstum und/oder einen möglichen Zellverlust hin.

An den HEP G2-Proben wurden dann wie bei den Jurkat-Zellproben mit Hilfe des „Glutathion-Recycling-Assay“ die $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Konzentrationen bestimmt und jeweils auf die eingesetzte Zellzahl bzw. den Proteingehalt nach der Inkubation bezogen (Abb. 20 und 21).

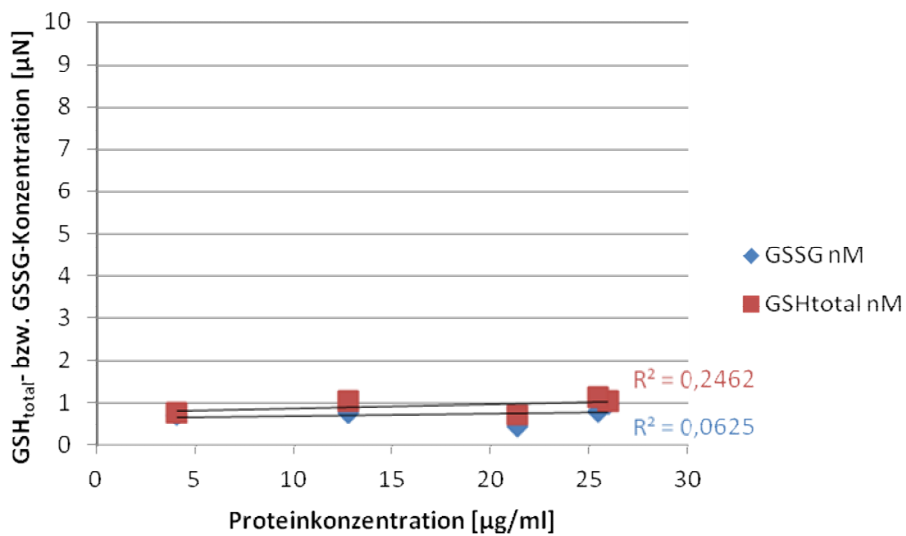


Abbildung 20: Abhängigkeit der GSH_{total} - bzw. GSSG-Konzentration von der jeweiligen Proteinkonzentration

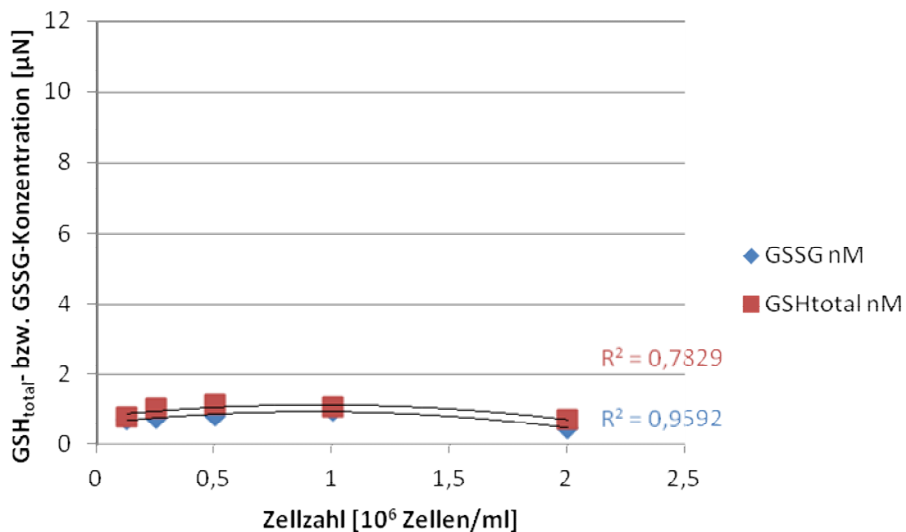


Abbildung 21: Abhängigkeit der GSH_{total} - bzw. GSSG-Konzentration von der eingesäten HEP G2-Zellzahl

Die erwartete lineare Abhängigkeit der bestimmten GSH_{total} - und GSSG-Konzentrationen von der Proteinkonzentration konnte bei den HEP G2-Zellen nicht nachgewiesen werden, da die GSH_{total} - und GSSG-Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze der Methode lagen (vgl. Abschnitt 5.2.2 und Abschnitt 5.5.5). Die Abhängigkeit von der Zellzahl kann ebenfalls aufgrund der zu kleinen Messwerte nicht interpretiert werden.

Für HEP G2-Zellen konnte die Optimierung des „Glutathion-Recycling-Assay“ nicht abgeschlossen werden. Es wurden erste Lösungsansätze zur Zellzahloptimierung und Proteinbestimmung aufgezeigt, aber die Aufarbeitung der adhärennten Zellen zu vitalen Einzelzellsuspensionen erfordert weitere Arbeiten.

5.4 Untersuchung von geeigneten Positivkontrollen

5.4.1 Jurkat

Für die Prüfung der Positivkontrolle wurden die Jurkat-Zellsuspension mit einer Zellzahl von 1×10^6 Jurkat-Zellen/ml mit 100 μM TBHP bzw. mit unterschiedlichen Konzentrationen (13, 26 und 52 μM) von BSO belastet. Die gemessenen $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Konzentrationen dieser Proben zeigen eine Beeinflussung des Glutathiongehaltes der Jurkat-Zellen durch die untersuchten Substanzen (Tab. 5).

Tabelle 5: $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Konzentrationen bei Belastung von Jurkat-Zellen mit TBHP oder BSO

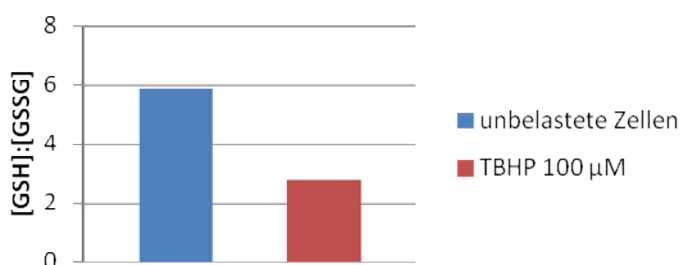
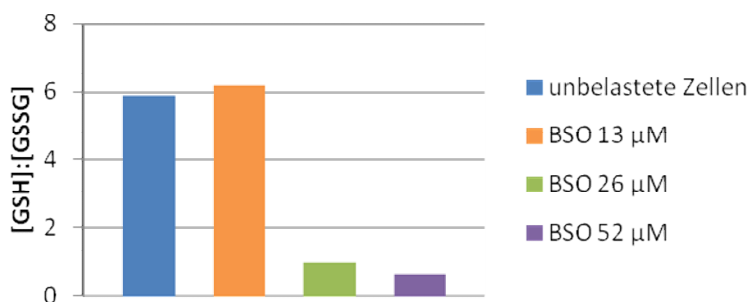
Prüfsubstanz	Konzentration der Prüfsubstanz in der Probe	$\text{GSH}_{\text{total}}$ -Konzentration	GSSG-Konzentration
Leerwert (unbelastete Probe)	---	4,6 μN	0,6 μN
TBHP	100 μM	3,7 μN	0,5 μN
Leerwert (unbelastete Probe)	---	8,6 μN	1,1 μN
BSO	13 μM	2,5 μN	0,3 μN
BSO	26 μM	2,0 μN	0,7 μN
BSO	52 μM	1,6 μN	0,6 μN

BSO bewirkt eine deutliche und konzentrationsabhängige Absenkung des Glutathiongehaltes und war wirkungsvoller als TBHP (Tab. 6). Auch die unbelasteten Zellen können in den einzelnen Versuchsansätzen, in Abhängigkeit von ihren physiologischen Zustand, Abweichungen in den $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Konzentrationen zeigen. Es ist deshalb, wie bereits beschrieben, in jedem Versuchsansatz eine Leerprobe mit unbelasteten Zellen mitzuführen.

Tabelle 6: Senkung des Glutathiongehaltes durch TBHP und BSO

Prüfsubstanz	Konzentration der Prüfsubstanz in der Probe	Verringerung der $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Konzentration [%]	Verringerung der GSSG-Konzentration [%]
TBHP	100 μM	20	22
BSO	13 μM	71	72
	26 μM	77	39
	52 μM	81	44

Der Einfluss der beiden Substanzen auf das $[\text{GSH}]:[\text{GSSG}]$ -Verhältnis ist in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt.

Abbildung 22: Senkung des $[\text{GSH}]:[\text{GSSG}]$ -Verhältnis durch TBHP in Jurkat-ZellenAbbildung 23: Senkung des $[\text{GSH}]:[\text{GSSG}]$ -Verhältnis durch BSO in Jurkat-Zellen

Es zeigte sich, dass sowohl TBHP (Abb. 22) als auch BSO (Abb. 23) nicht nur die absoluten Konzentrationen an $\text{GSH}_{\text{total}}$ und GSSG sondern auch das $[\text{GSH}]:[\text{GSSG}]$ -Verhältnis der Jurkat-Zellen senken können und damit für den Einsatz als Positivkontrollen geeignet sind. Im Vergleich zu TBHP scheint BSO eine größere Wirkung bei geringerer Konzentration auf das $[\text{GSH}]:[\text{GSSG}]$ -Verhältnis zu besitzen, was diese Substanz gegenüber TBHP attraktiver für den Einsatz als Positivkontrolle macht. Die in der Literatur angegebene Hemmung der GSH-Synthese durch das BSO

scheint hier eine größere Wirkung auf den Glutathionspiegel zu haben als die Oxidationskraft des TBHPs.

5.4.2 HEP G2

Für die Prüfung der Positivkontrolle wurden der HEP G2-Zellsuspension mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml unterschiedliche Konzentrationen von BSO zugegeben.

Eine Beeinflussung der $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Konzentration durch die Zugabe des BSO konnte nicht festgestellt werden (Tab. 7), da die unbelastete Probe bereits so wenig Glutathion enthielt, dass der Messwert unter der Bestimmungsgrenze der Methode lag. Auf die Untersuchung von TBHP als Positivkontrolle wurde deshalb bei den HEP G2-Zellen verzichtet, da zuvor noch Arbeiten zur Optimierung der Zellaufbereitung erfolgen müssen.

Tabelle 7: $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Konzentrationen bei Belastung von HEP G2-Zellen mit BSO

Prüfsubstanz	Konzentration der Prüfsubstanz in der Probe	$\text{GSH}_{\text{total}}$-Konzentration	GSSG-Konzentration
Leerwert (unbelastete Probe)	---	0,3 μN	0,1 μN
BSO	13 μM	0,7 μN	0 μN
BSO	26 μM	0,5 μN	0 μN

5.5 Statistische Parameter

Die Optimierung des „Glutathion-Recycling-Assay“ dient dem künftigen Einsatz des Testverfahrens in einer Testbatterie zur Toxizitätsbewertung von trinkwasserrelevanten Einzelsubstanzen und Wasserproben. Zu diesem Zweck ist eine anschließende Validierung der optimierten Methode erforderlich. Erste Untersuchungen zur Validierung der Methode werden in dieser Arbeit behandelt. Die Validierung von Analysenmethoden ist der dokumentierte Nachweis, dass diese die an sie gestellten Anforderungen erfüllen und für den beabsichtigten Einsatzzweck geeignet sind. Um die Validierung von Methoden möglichst einheitlich zu gestalten, wurden Bestimmungen und Leitlinien verfasst, die je nach Einsatz der Methode zu erfüllen sind. Als Grundlage der Validierung des „Glutathion-Recycling-Assay“ wird die „Leitlinie zur Methodenvvalidierung im BLMP“ [Wellmitz, 2005] verwendet.

5.5.1 Linearität

In einem ersten Schritt wurde die Linearität der Kalibrierkurven untersucht. Die Linearität bezeichnet die Proportionalität zwischen dem erhaltenen Messsignal mit der zu bestimmenden Analytkonzentration (GSSG bzw. $\text{GSH}_{\text{total}}$), wobei ein proportionaler Zusammenhang auch erst nach einer Umrechnung vorhanden sein kann [Wellmitz, 2005; URL 12].

Zur Prüfung auf Linearität der Kalibrierung wurden zunächst entsprechend dem Mandel-Test [URL 13] Polynome ersten und zweiten Grades an die Kalibrierpunkte angepasst und die Bestimmtheitsmaße ermittelt (Abb. 24). Bei dem Vergleich der Bestimmtheitsmaße der linearen und der quadratischen Kalibrierfunktion zeigt sich für die $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Bestimmung und weniger ausgeprägt auch für die GSSG-Bestimmung eine bessere Anpassung durch die quadratische Funktion.

Ursache für die Krümmung der Kalibrierkurve kann ein Pipettenfehler sein. Die Pipette müsste dazu permanent zu viel dosiert haben.

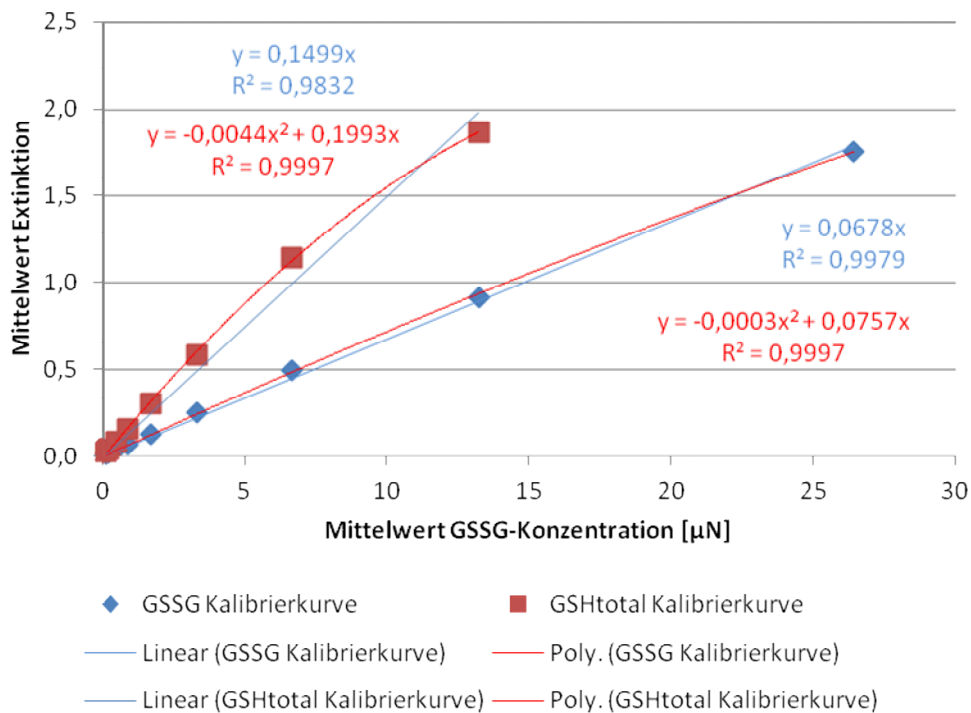


Abbildung 24: Prüfung der Linearität der GSSG- und GSH_{total}-Kalibrierkurve (t = 5 min)

Bei der Bestimmung von GSH_{total}- bzw. GSSG-Konzentrationen mithilfe einer quadratischen Kalibrierkurve können deshalb genauere Ergebnisse als bei der Verwendung von linearen Kalibrierkurven erhalten werden. Ein möglicher Pipettenfehler könnte somit ausgeglichen werden.

Die Untersuchung der Richtigkeit (vgl. Abschnitt 5.5.3) der Messergebnisse bei Verwendung von linearen und quadratischen Kalibrierfunktionen ergab, dass die Verwendung der linearen Kalibrierfunktion zu Konzentrationsbestimmungen mit einer geringeren Genauigkeit führt und nur bis zu 6,6 µN GSH_{total} verwendet werden kann.

5.5.2 Präzision

Mit diesem Parameter können Aussagen über die Streuung der Messwerte aufgrund eines zufälligen Fehlers getroffen werden [Wellnitz, 2005]. Dazu wird die Standardabweichung von Analysenwerten aus identisch wiederholten Messungen (gleiche Bedingungen, z.B. Methode, Labor, Person, Geräte) betrachtet (Wiederholpräzision) [URL 14]. Eine hohe Präzision der Messung ist demnach vorhanden, wenn die Messwerte nur eine geringe Streuung aufweisen.

Zur Untersuchung der Präzision wurde daher die Standardabweichung der gemessenen GSSG- und GSH_{total}-Konzentrationen aus vier Versuchen für jede Einwaage bestimmt (Tab. 8, 9).

Tabelle 8: Standardabweichung der GSSG-Konzentrationen zum Zeitpunkt t = 5 min

Einwaagen [μN]	gemessene GSSG-Konzentration [μN]				Standard- abweichung [μN]	relative Standard- abweichung [%]
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4		
0,103	0,090	0,136	0,161	0,276	0,08	77
0,207	0,167	0,215	0,321	0,394	0,10	50
0,413	0,449	0,498	0,584	0,631	0,08	20
0,825	0,834	0,882	0,993	1,085	0,11	14
1,65	1,707	1,799	1,854	2,032	0,14	8
3,3	3,415	3,563	3,810	3,649	0,17	5
6,6	6,637	7,183	7,036	7,120	0,25	4
13,2	13,145	12,817	12,803	12,761	0,18	1

Tabelle 9: Standardabweichung der GSH_{total}-Konzentrationen zum Zeitpunkt t = 5 min

Einwaagen [μN]	gemessene GSH _{total} -Konzentration [μN]				Standard- abweichung [μN]	relative Standard- abweichung [%]
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4		
0,103	0,157	0,135	0,120	0,176	0,02	24
0,207	0,234	0,212	0,200	0,290	0,04	19
0,413	0,490	0,490	0,457	0,560	0,04	10
0,825	0,912	0,895	0,937	1,036	0,06	8
1,65	1,785	1,716	1,851	1,927	0,09	5
3,3	3,322	3,350	3,640	3,617	0,17	5
6,6	6,536	6,544	6,840	6,974	0,22	3

Für GSH- bzw. GSSG-Konzentrationen über der jeweiligen Nachweisgrenze (1,6 μN GSH_{total}, 2,3 μN GSSG, vgl. Abschnitt 5.5.5) liegen die relativen Standardabweichungen bei maximal 8 %.

Die relative Standardabweichung sinkt mit steigender $\text{GSH}_{\text{total}}$ - bzw. GSSG-Konzentration. Die Messung niedriger Konzentrationen ist deshalb nur noch mit geringer Präzision möglich.

5.5.3 Richtigkeit

Die Richtigkeit beschreibt, wie weit der gemessene Wert (Mittelwert eines Datensatzes) vom wahren Wert abweicht [Wellnitz, 2005].

Für die Überprüfung der Richtigkeit der Messergebnisse wurden jeweils Lösungen mit unterschiedlichen $\text{GSH}_{\text{total}}$ - bzw. GSSG-Konzentrationen an verschiedenen Tagen hergestellt und deren Konzentrationen photometrisch bestimmt (jeweils in Doppelbestimmung). Die Mittelwerte der so bestimmten Konzentrationen liegen für alle eingesetzten GSSG-Konzentrationen und für $\text{GSH}_{\text{total}}$ -Konzentrationen $\leq 6,6 \mu\text{N}$ im Erwartungsbereich (Einwaage \pm dreifache Standardabweichung) (Tab. 10 und 11).

Tabelle 10: Überprüfung der Richtigkeit der GSSG-Messergebnisse (lineare Kalibrierkurve)

Einwaagen	Messwert*	Standard- abweichung* [μN]	Erwartungsbereich [μN] mit 3-facher Standardabweichung	Messwert im Erwartungsbereich? **
0,103	0,17	0,08	[-0,13; 0,34]	o
0,207	0,27	0,10	[-0,10; 0,52]	o
0,413	0,54	0,08	[0,17; 0,66]	o
0,825	0,95	0,11	[0,49; 1,16]	o
1,65	1,85	0,14	[1,24; 2,06]	o
3,3	3,61	0,17	[2,80; 3,80]	o
6,6	6,99	0,25	[5,86; 7,34]	o
13,2	12,88	0,18	[12,67; 13,73]	o
26,4	24,99	0,49	[24,94; 27,86]	o

Tabelle 11: Überprüfung der Richtigkeit der GSH_{total}-Messergebnisse (lineare Kalibrierkurve)

Einwaagen	Messwert*	Standard- abweichung* [μ N]	Erwartungsbereich [μ N] mit 3-facher Standardabweichung	Messwert im Erwartungsbereich? **
0,103	0,15	0,02	[0,03; 0,18]	o
0,207	0,23	0,04	[0,09; 0,33]	o
0,413	0,50	0,04	[0,28; 0,54]	o
0,825	0,94	0,06	[0,64; 1,01]	o
1,65	1,82	0,09	[1,38; 1,92]	o
3,3	3,48	0,17	[2,79; 3,81]	o
6,6	6,72	0,22	[5,94; 7,26]	o
13,2	12,92	0,05	[13,04; 13,36]	x

* Mittelwerte der gemessenen GSSG- bzw. GSH_{total}-Konzentrationen

** o - Mittelwert der gemessenen GSSG- bzw. GSH_{total}-Konzentrationen befindet sich im Erwartungsbereich

x - Mittelwert der gemessenen GSSG- bzw. GSH_{total}-Konzentrationen befindet sich **nicht** im Erwartungsbereich

Die GSH_{total}-Messwerte für Konzentrationen $\geq 6,6 \mu\text{N}$ liegen unterhalb des Erwartungsbereichs, wie auch an der Krümmung der Kalibrierkurve (siehe Abschnitt 5.5.1 Linearität, Abb. 24) zu sehen ist. Nicht nur bei der GSH_{total}-Messung tritt eine Krümmung der Kalibrierkurve auf, sondern auch bei Messungen der GSSG-Konzentration.

Deshalb wurde die Richtigkeit der GSH_{total}- und der GSSG-Messungen unter Verwendung quadratischer Kalibrierkurven untersucht (Tab. 12 und 13). Die so erhaltenen GSSG- und GSH_{total}-Werte liegen alle im Erwartungsbereich mit einer 3-fachen Standardabweichung und sogar in einem Erwartungsbereich mit einer 2-fachen Standardabweichung.

Tabelle 12: Überprüfung der Richtigkeit der GSSG-Messergebnisse (quadratische Kalibrierkurve)

Einwaagen	Messwert*	Standard-abweichung* [μN]	Erwartungsbereich [μN] mit 2-facher Standardabweichung	Messwert im Erwartungsbereich? **
0,103	0,15	0,08	[-0,12; 0,33]	o
0,207	0,25	0,10	[-0,09; 0,50]	o
0,413	0,50	0,08	[0,17; 0,66]	o
0,825	0,87	0,12	[0,47; 1,18]	o
1,65	1,71	0,15	[1,19; 2,11]	o
3,3	3,39	0,18	[2,76; 3,84]	o
6,6	6,75	0,15	[6,16; 7,04]	o
13,2	12,98	0,24	[12,48; 13,92]	o
26,4	26,46	0,05	[26,25; 26,55]	o

Tabelle 13: Überprüfung der Richtigkeit der GSH_{total}-Messergebnisse (quadratische Kalibrierkurve)

Einwaagen	Messwert*	Standard-abweichung* [μN]	Erwartungsbereich [μN] mit 2-facher Standardabweichung	Messwert im Erwartungsbereich? **
0,103	0,13	0,02	[0,06; 0,15]	o
0,207	0,21	0,03	[0,14; 0,27]	o
0,413	0,45	0,04	[0,33; 0,49]	o
0,825	0,85	0,04	[0,75; 0,90]	o
1,65	1,66	0,04	[1,58; 1,72]	o
3,3	3,26	0,02	[3,25; 3,35]	o
6,6	6,57	0,07	[6,46; 6,74]	o
13,2	13,28	0,10	[13,00; 13,40]	o

* Mittelwerte der gemessenen GSSG- bzw. GSH_{total}-Konzentrationen

** o - Mittelwert der gemessenen GSSG- bzw. GSH_{total}-Konzentrationen befindet sich im Erwartungsbereich

x - Mittelwert der gemessenen GSSG- bzw. GSH_{total}-Konzentrationen befindet sich **nicht** im Erwartungsbereich

Für Bestimmungen der GSH_{total}- und GSSG-Konzentrationen im Bereich $\leq 6,6 \mu\text{N}$ sind lineare Kalibrierkurven ausreichend. Für besonders sensitive Bestimmungen und für Konzentrationen $> 6,6 \mu\text{N}$ sollten quadratische Kalibrierkurven verwendet werden.

5.5.4 Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate beurteilt, ähnlich der Genauigkeit, die Güte bzw. Richtigkeit eines Messverfahrens [URL 15; URL 16]. Sie stellt das Verhältnis zwischen dem Ist-Wert (Messwert) und dem Soll-Wert (Referenzwert) dar [Wellnitz, 2005] und berechnet sich aus dem Quotient dieser beiden Größen (Formel 2), wobei das Ergebnis meist in Prozent angegeben wird.

Formel 2: Wiederfindungsrate

$$\text{Wiederfindungsrate} = \frac{\text{Ist-Wert}}{\text{Soll-Wert}} * 100$$

Zur Berechnung der Wiederfindungsrate (Tab. 14) wurden jeweils die Mittelwerte der bestimmten Konzentrationen (vgl. Tab. 10, 11, 12 und 13) durch die zugehörigen Einwaagen dividiert.

Tabelle 14: Wiederfindungsraten der GSH_{total}- und GSSG-Bestimmung bei Verwendung von linearen und quadratischen Kalibrierkurven

<i>Einwaage [μN]</i>	<i>GSH_{total}-Wiederfindungsrate</i>		<i>GSSG-Wiederfindungsrate</i>	
	lineare Kalibrierkurve	quadratische Kalibrierkurve	lineare Kalibrierkurve	quadratische Kalibrierkurve
	[%]	[%]	[%]	[%]
0,103	143	128	161	147
0,207	113	101	133	122
0,413	121	109	131	120
0,825	115	103	115	106
1,65	110	101	112	104
3,3	106	99	109	103
6,6	102	99	106	102
13,2	98	101	98	98
26,4	86	100	95	100

Es zeigte sich auch hier, dass die Wiederfindungsraten bei Verwendung quadratischer Kalibrierkurven näher bei 100 % liegen, als unter Verwendung von linearen Kalibrierkurven.

Die Wiederfindungsraten weichen bei kleinen Konzentrationen stärker von 100 % ab, da in diesem Bereich Messungenauigkeiten der Extinktionsbestimmung eine größere Rolle spielen. Für GSH- bzw. GSSG-Konzentrationen über der jeweiligen Nachweisgrenze (1,6 µN GSH, 2,3 µN GSSG, vgl. Abschnitt 5.5.5) liegen die Wiederfindungsraten unter Verwendung quadratischer Kalibrierkurven zwischen 99 % und 101 % bzw. zwischen 98 % und 103 %.

5.5.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze stellt den kleinsten Messwert dar, der qualitativ gerade noch zuverlässig nachgewiesen werden kann [URL 17] und sich dadurch vom Blindwert unterscheiden lässt [URL 18]. Diese Charakteristika machen die Nachweisgrenze zu einer Entscheidungsgrenze [Wellmitz, 2005]. Für eine Probe mit einer Analytkonzentration, die der Nachweisgrenze entspricht, ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % der Analyt gerade noch bzw. nicht mehr nachweisbar [URL 16].

Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgt mit dem Mittelwert und der dreifachen Standardabweichung des Blindwertes (Formel 3) [URL 12].

Formel 3: Nachweisgrenze

$$\text{Nachweisgrenze} = 3s_B$$

s_B - Standardabweichung des Blindwertes

Die Bestimmungsgrenze gibt die kleinste quantitativ detektierbare Konzentration eines Analyten mit einer festgelegten Präzision (z.B. eine relative Standardabweichung von 33,3 %) an [Wellmitz, 2005; URL 14] und liegt damit oberhalb der Nachweisgrenze [URL 16]. Sie kann aus der dreifachen Nachweisgrenze annäherungsweise berechnet werden (Formel 4) [URL 19; URL 18, URL 16].

Formel 4: Bestimmungsgrenze

$$\text{Bestimmungsgrenze} = 9s_B$$

s_B Standardabweichung des Blindwertes

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden die gemessenen Extinktions-Blindwerte mittels der jeweiligen Kalibrierkurven in Konzentrationswerte

umgerechnet. Dabei ergaben sich für $\text{GSH}_{\text{total}}$ und GSSG nur geringfügig unterschiedliche Werte in Abhängigkeit vom Grad des Polynoms der Kalibrierkurve. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde anschließend aus der Standardabweichung dieser Konzentrationswerte entsprechend Formel 2 und 3 berechnet (Tab. 15).

Tabelle 15: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Messung mit linearer und quadratischer Kalibrierkurve

	$\text{GSH}_{\text{total}}$ (linear)	$\text{GSH}_{\text{total}}$ (quadratisch)	GSSG (linear)	GSSG (quadratisch)
Nachweisgrenze [μN]	1,8	1,6	2,3	2,3
Bestimmungsgrenze [μN]	5,5	4,8	7,0	6,9

6 Ausblick

Mithilfe des „Glutathion-Recycling-Assay“ können Aussagen über die Entwicklung von oxidativem Stress in Gewebezellen durch Belastung mit Prüflösungen (z.B. trinkwasserrelevante Reinsubstanzen und Wasserproben) getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die Methode für die Verwendung der Suspensions-Blutzellkultur Jurkat für den künftigen Einsatz in einer bereits bestehenden Testbatterie optimiert. Die ermittelten statistischen Parameter belegen die Richtigkeit der Methode.

Bei Einsatz der Methode in der Testbatterie werden noch Anpassungen hinsichtlich der Messpräzision sowie der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgen, in Abhängigkeit von den jeweiligen zu untersuchenden Proben.

Eine Möglichkeit hierfür ist der Ersatz des im Assay zur Maskierung des GSH verwendeten 2-Vinylpyridins. Es ist bekannt, dass 2-VP die Farbentwicklung hemmt [URL 10]. Deshalb würden sich beim Ersatz von 2-VP durch eine Substanz, welche keinen Einfluss auf die Farbentwicklung hat, bei gleicher Konzentration von GSSG und gleicher Messzeit höhere Extinktionen ergeben. Daraus würde dann eine niedrigere Nachweisgrenze resultieren. Einen möglicher Ersatzstoff könnte das 1-Methyl-2-Vinylpyridinium-Trifluoromethansulfonat darstellen, da es ebenfalls eine Thiol-maskierende Wirkung besitzt [Hajas et al, 2012] und im Vergleich zu 2-Vinylpyridin auch noch eine geringere Toxizität aufweist [URL 20; URL 21].

Ein GSH-Maskierungsreagenz ohne Einfluss auf die Farbentwicklung hätte den zusätzlichen Vorteil, dass $\text{GSH}_{\text{total}}$ und GSSG mit denselben Standardlösungen kalibriert werden können (eine Kalibrierkurve für $\text{GSH}_{\text{total}}$ und GSSG). Die resultierende Reduktion der benötigten wells in einer Multiwellplatte ermöglicht die zeitgleiche $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Bestimmung. Das führt zu einer Verbesserung der Präzision des $[\text{GSH}]:[\text{GSSG}]$ -Verhältnisses. Außerdem sind günstige Auswirkungen auf den Arbeitsaufwand und den Materialverbrauch ein wichtiger Faktor für die Integration dieser Methode in eine Testbatterie.

Die zwei zur Positivkontrolle eingesetzten Substanzen (THBP und BSO) erwiesen sich als geeignet für den Einsatz im „Glutathion-Recycling-Assay“ mit Jurkat-Zellen und können bei künftigen Versuchsreihen eingesetzt werden. Gegebenenfalls können dabei die einzusetzenden Konzentrationen dieser Substanzen sowie die Belastungsdauer noch weiter optimiert werden.

In dieser Arbeit wurden Versuche durchgeführt, den „Glutathion-Recycling-Assay“ an eine adhärente Leberzellkultur (HEP G2) anzupassen. Die geringen Proteingehalte der Proben nach der 24-stündigen Inkubationszeit und die niedrigen Glutathiongehalte zeigen aber, dass für diese Zellen die Zellvorbereitung (Einsaat, Belastung und Zellaufbereitung) verbessert werden muss, um eine größere Anzahl an lebensfähigen Zellen für den Assay zur Verfügung zu haben. Dabei muss zusätzlich die Zellaggregation verringert werden. Erst dann ist es möglich, den Assay mit dieser Zelllinie in die Testbatterie aufzunehmen.

Aufbauend auf den mit HEP G2-Zellen gewonnenen Erfahrungen ist eine Anpassung der Methode an eine neuronale Zelllinie (z.B. SH SY5Y) geplant. Durch die Durchführung des „Glutathion-Recycling-Assay“ mit diesen Zellen wird eine Erweiterung der Aussagen auf das Gebiet der Neurotoxikologie möglich.

7 Zusammenfassung

Das zelleigene Molekül Glutathion (GSH) spielt eine wichtige Rolle beim Abbau und der Ausscheidung von Schadstoffen. Bei antioxidativen Abwehrreaktionen von schädlichen ROS, die überwiegend beim Fremdstoffmetabolismus entstehen, wird GSH in seine oxidierte Form, das Glutathion-Disulfid (GSSG) umgewandelt. Das Verhältnis von [GSH] zu [GSSG] stellt daher einen wichtigen Indikator für oxidativen Stress in Zellen dar. Dieser Umstand macht es attraktiv für toxikologische Untersuchungen, z.B. von trinkwasserrelevanten Reinsubstanzen und Wasserproben.

Owens und Belcher [Owens, Belcher; 1965] entwickelten eine Methode, um den Glutathiongehalt in biologischen Proben zu messen. Diese Methode basiert auf einer enzymatisch gesteuerten Kreislaufreaktion („Glutathion-Recycling-Assay“), bei der ein Farbstoff (TNB) proportional zur GSH-Konzentration gebildet wird.

Zur Integrierung dieser Methode in eine bestehende Testbatterie zur Toxizitätsbeurteilung von trinkwasserrelevanten Reinsubstanzen und Wasserproben wurden verschiedene Messparameter optimiert. Da bei der Recycling-Reaktion die photometrisch bestimmte Farbstoffkonzentration von der Zeit abhängig ist, muss ein geeigneter Messzeitpunkt festgelegt werden, bei dem die gemessenen Extinktionswerte im Messbereich des Photometers liegen. Hierbei zeigte sich, dass nicht ein optimaler Messzeitpunkt existiert, sondern dass er für jede Analyse in Abhängigkeit von der erwarteten Konzentration und der geforderten Empfindlichkeit separat gewählt werden muss. In den meisten Fällen ist aber ein Messzeitpunkt nach 5 min Reaktionsablauf geeignet.

Die eingesäte Zellzahl, die für den Recycling-Assay verwendet wird, beeinflusst ebenfalls das Messergebnis. Für die Bestimmung einer optimalen einzusäenden Zellzahl muss jeweils nach der Zelllinie unterschieden werden. Bei Jurkat-Zellen erwies sich ein großer Bereich von $1 - 8 \times 10^6$ Zellen/ml als geeignet. Kleinere Zellzahlen erhöhen die Messungenauigkeit zu stark, größere Zellkonzentrationen können so viel Glutathion enthalten, dass der Messbereich des Photometers überschritten wird.

Bei HEP G2-Zellen konnte kein optimaler Zellzahlbereich für die Zelleinsaat ermittelt werden. Die gemessenen $\text{GSH}_{\text{total}}$ - und GSSG-Konzentrationen liegen unabhängig von

der eingesetzten Zellzahl im Bereich von 0,3 – 1,1 μ N und damit unter der Bestimmungsgrenze der Methode.

Weiterhin wurden die eingesäte Zellzahl (vor der 24-stündigen Inkubationszeit) und die Proteinkonzentration (nach der 24-stündigen Inkubationszeit) als Bezugsgröße für das gemessene GSH_{total} bzw. GSSG untersucht. Dabei sind bei den Jurkat-Zellen die gemessenen GSH_{total}- bzw. GSSG-Konzentrationen proportional zur Proteinkonzentration nach der Inkubationszeit aber nicht zur eingesäten Zellzahl. Ursache hierfür ist das Zellwachstum während der Inkubationszeit. Als Bezugsgröße für die gemessenen GSH_{total}- bzw. GSSG-Konzentrationen sind dennoch beide Größen verwendbar, bei entsprechendem Versuchsansatz und Bewertung.

Des Weiteren wurden zwei Substanzen, TBHP und BSO, auf ihre Eignung als Positivkontrollen für die GSH_{total}- und GSSG-Messung untersucht. Anhand erster Tests konnte die Glutathionspiegel senkende Wirkung beider Substanzen an Jurkat-Zellen und damit auch ihre Eignung als Positivkontrollen für den „Glutathion-Recycling-Assay“ gezeigt werden. Insgesamt konnte bei der Belastung von Jurkat-Zellen mit BSO eine stärkere Glutathiongehalt-senkende Wirkung als mit TBHP gezeigt werden.

Die Kalibrierkurven für die GSH_{total}- und GSSG-Bestimmung aus den Extinktionswerten waren nicht linear. Eine lineare Regression kann nur für Abschätzungen verwendet werden, besser ist hier das Polynom 2. Ordnung. Die Prüfung der Richtigkeit der GSH_{total}- und GSSG-Bestimmung ergab bei Verwendung von quadratischen Kalibrierkurven, dass alle gemessenen Werte innerhalb des Erwartungsbereiches mit zweifacher Standardabweichung lagen. Dagegen lagen bei Verwendung von linearen Kalibrierkurven nur Werte $\leq 6,6 \mu$ N im Erwartungsbereich mit dreifacher Standardabweichung.

Die Nachweisgrenze der GSH_{total}- und GSSG-Bestimmung wurde mit 1,6 bzw. 2,3 μ N nach der Leerwertmethode bestimmt. Bei Verwendung von quadratischen Gleichungen für die Kalibrierkurven findet man eingewogene GSH- bzw. GSSG-Konzentrationen, welche über der Nachweisgrenze liegen, mit Wiederfindungsraten von 99 – 101 % bzw. 98 – 103% wieder. Die Standardabweichung der GSH_{total}- und GSSG-Bestimmung für Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze beträgt maximal 8 %.

Insgesamt ist der „Glutathion-Recycling-Assay“ zur Toxizitätsbeurteilung von trinkwasserrelevanten Reinsubstanzen und Wasserproben mit Hilfe von Jurkat-Zellen geeignet, es muss aber noch die Messpräzision verbessert und die Nachweis- und Bestimmungsgrenze gesenkt werden. Für HEP G2-Zellen müssen zunächst noch die zellvorbereitenden Schritte (Einsaat, Belastung und Zellaufbereitung) verbessert werden, um eine ausreichende Anzahl an lebenden Zellen für den Assay zur Verfügung zu haben.

8 Summary

The cellular molecule glutathione (GSH) plays an important role in the degradation and excretion of pollutants. In the process of antioxidative defence against harmful ROS which mainly originate from the xenobiotic metabolism, GSH is oxidised to glutathione disulfide (GSSG). Hence, the relation of [GSH] to [GSSG] represents an important indicator of oxidative stress. This fact makes it attractive for toxicological investigations, e.g., from pure substances relevant for drinking-water and water samples.

Owens and Belcher [Owens, Belcher; 1965] developed a method for measuring the glutathione content in biological samples. This method is based on an enzymatically controlled cycle reaction (glutathione recycling assay) forming a dye (TNB) proportionally to the GSH concentration.

Different measuring parameters were optimised to integrate this method into an existing test battery for determination of toxicity of pure substances relevant for drinking-water and water samples. Due to the time dependence of the photometrically measured dye concentration during the recycling reaction, and the fact that the measured extinction values should lie in the measuring range of the photometer, a suitable measuring time must be fixed. It was shown that no optimum measuring time exists, but that it has to be chosen separately for every analysis in dependence of the expected concentration and the demanded sensitivity. However, in most cases a measuring time of 5 min is suitable.

The starting cell number which is used for the recycling assay also influences the measuring result. For determination of an optimum starting cell number it must be distinguished between cell lines. For Jurkat cells $1 - 8 \times 10^6$ cells/ml have proved to be suitable. Smaller cell numbers increase the measuring inaccuracy too strongly, higher cell concentrations can contain so much glutathione that the measuring range of the photometer is exceeded.

With HEP G2 cells no optimum range of starting cell numbers could be determined. Independent of the used starting cell number the measured $\text{GSH}_{\text{total}}$ - and GSSG

concentrations are in the range between 0.3 – 1.1 μN , which is below the limit of determination of the method.

Furthermore the starting cell number (before 24-hour incubation period) and the protein concentration (after 24-hour incubation period) were examined as a reference unit for the measured $\text{GSH}_{\text{total}}$ or GSSG values. For Jurkat cells measured $\text{GSH}_{\text{total}}$ or GSSG concentrations are proportional to the protein concentration after the incubation period, however, not to the starting cell number. This is caused by cell growth during the incubation period. Nevertheless, both parameters are suitable as a reference unit for measured $\text{GSH}_{\text{total}}$ or GSSG concentrations, however statements obtained differ.

Besides, the suitability of the two substances TBHP and BSO as positive controls for the $\text{GSH}_{\text{total}}$ and GSSG measurements were examined. First tests showed the GSH depletion effect of both substances in Jurkat cells. Thus, these substances are suitable as positive controls for the glutathione recycling assay. In Jurkat cells, BSO showed stronger glutathione depletion than TBHP.

The calibration curves for $\text{GSH}_{\text{total}}$ and GSSG calculation from the extinction values were not linear. A linear regression can only be used for estimation, the 2nd order polynome is better in this case. The check of the trueness of $\text{GSH}_{\text{total}}$ and GSSG determination using square calibrating curves shows that all measured values were within the expectation range \pm double standard deviation. However, by use of linear calibrating curves only values $\leq 6.6 \mu\text{N}$ were in the expectation range \pm triple standard deviation.

The limit of detection for $\text{GSH}_{\text{total}}$ and GSSG determination was calculated as 1.6 and 2.3 μN , respectively by use of blank values. By use of square equations for the calibrating curves the used GSH resp. GSSG concentrations which are above the limit of detection were recovered with recovery of 99 – 101% resp. 98 – 103%. The standard deviation of $\text{GSH}_{\text{total}}$ and GSSG determination is less than 8 % for concentrations above the limit of detection.

In Summary the glutathione recycling assay is suitable for determination of toxicity of pure substances relevant for drinking-water and water samples using of Jurkat cells,

however, the measuring precision must still be improved and the limit of detection and the limit of determination have to be decreased.

For HEP G2 cells the steps of the cell preparation (sow cells, strain cells and cell exposure) must be improved at first, thereby increasing the amount of cells available for the assay.

Literaturverzeichnis

Bradford, Marion M. (1976): *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry* **72**, 248-254

Broquist, Harry P. (2009): *Buthionine sulfoximine, an experimental tool to induce glutathione deficiency: elucidation of glutathione and ascorbate in their role as antioxidants. Nutrition Reviews* **50**, 110-111

Casey, S. A.; Brewster, D.; Viau, C.; Acosta, D. (1994): *Effect of glutathione depletion and oxidative stress on the in vitro cytotoxicity of velnacrine maleate. Toxicol. Lett.* **76**, 257-265

Fent, Karl (2003): *Ökotoxikologie*. 2. Aufl.: Georg Thieme Verlag

Freeman, M. L.; Sierra-Rivera, E.; Voorhees, G. J.; Eisert, D. R.; Meredith, M. J. (1993): *Synthesis of hsp-70 is enhanced in glutathione-depleted HEP G2 cells. Radiat. Res.* **135**, 387-393

Griffith, Owen W. (1980): *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochemistry* **106**, 207-212

Griffith, Owen W. (1982): *Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione. The Journal of Biological Chemistry* **257**, 13704-13712

Griffith, Owen W.; Meister, Alton (1979): *Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). The Journal of Biological Chemistry* **254**, 7558-7560

Griffith, Owen W. (1999): *Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radical Biology and Medicine* **27**, 922-935

Hajas, Gyorgy; Basci, Attila; Aguilera-Aguirre, Leopoldo; German, Peter; Radak, Zsolt; Sur, Sanjiv; Hazra, Tapas K.; Boldogh, Istvan (2012): *Biochemical identification*

of a hydroperoxide derivative of the free 8-oxo-7,8-dihydroguanine base. Free Radical Biology and Medicine **52**, 749-756

Heinze, Rita (2012), mündliche Mitteilungen zu institutsinternen Anleitungen von einzelnen Versuchen, UBA Fachgebiet II 3.6

Marquard, Hans; Schäfer, Siegfried (2004): *Lehrbuch der Toxikologie*. 2. Aufl.: wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Mikasa, H.; Ageta, T.; Mizoguchi, N.; Kodama, H. (1980): *Determination of glutathione and glutathione disulfide in rat tissues using isotachophoretic analyzer. Analytical Biochemistry* **126**, 207-212

Nancke, Grit (2012): *Einsatz von zellbasierten Testverfahren zum Nachweis von Schadwirkungen im Wasserkreislauf*. Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Belegarbeit

Owens, C. W. I.; Belcher, R. V. (1965): *A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. Biochem. J.* **94**, 705

Rahman, Irfan; Kode, Aruna; Biswas, Saibal K. (2007): *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nature Protocols* **1**, 3159 – 3165 | doi:10.1038/nprot.2006.378 URL: <http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n6/full/nprot.2006.378.html>

Stock, Jan (2005): *Zytotoxizität von Treosulfan nach Glutathiondepletion durch BSO bei humanen Glioblastomzellen*. Tübingen, Eberhard-Karls-Universität, Medizinischen Fakultät, Inaugural-Dissertation

Tietze, Frank (1969): *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Analytical Biochemistry* **27**, 502-522

Wellmitz, Jörg (2005): *Leitlinie zur Methodenvalidierung*. Umweltbundesamt, Fachgebiet II 2.5, Qualitätssicherungsstelle im Bund/Länder-Messprogramm Nord- und Ostsee (BLMP)

- URL 1 (13/08/2012): *Glossar: Glutathion*. URL: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/g/gl/glutathion.glos.html>
- URL 2 (11/08/2012): *Glutathione disulfide*. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_disulfide
- URL 3 (15/08/2012): *Modes of base pairing for 8oxoG*. URL: http://www.nature.com/nature/journal/v431/n7005/fig_tab/nature02908_F1.html
- URL 4 (01/08/2012) Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung IFA: *tert-Butylhydroperoxid*. URL: [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/029660.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/029660.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0)
- URL 5 (14/08/2012): Luperox[®] TBH70X, *tert*-Butyl hydroperoxide solution. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/458139?lang=de®ion=DE>
- URL 6 (14/08/2012): *DL-Buthionine-(S,R)-sulfoximine*. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b2640?lang=de®ion=DE>
- URL 7 (15/08/2012) Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: *Cell line: Jurkat*. URL: http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-282.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192
- URL 8 (15/08/2012) Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: *Cell line: HEP G2*. URL: http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-180.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192
- URL 9 (14/08/2012): *Proteinbestimmung nach Bradford*. URL: http://www.biologie.uni-hamburg.de/lehre/mikro/kurs2_netz/bradford.pdf
- URL 10 (12/05/2012) Cayman Chemical Company: *Glutathione Assay Kit*. URL: <http://www.caymanchem.com/pdfs/703002.pdf>

- URL 11 (14/08/2012) Peter v. Sengbusch: *Vielzellige Pflanzen, Arbeitsteilung*. URL: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d42/42f.htm#03>
- URL 12 (15/08/2012): *Grundbegriffe der Statistik*. URL: http://vsa.labeaux.ch/docs_public/Grundbegriffe%20der%20Statistik.pdf
- URL 13 (15/08/2012) Neitzel, Volkmar: *Lineare Kalibrationsfunktionen*. URL: <http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/CLB1.pdf>
- URL 14 (15/08/2012) Warnke, Jörg; Hoffmann, Thorsten: *Quantifizierung in der Analytischen Chemie*. URL: http://www.ak-hoffmann.chemie.uni-mainz.de/pdf/script/SoSe_07-Statistik-Vorlesung.pdf
- URL 15 (15/08/2012): *Glossar: Wiederfindungsrate*. URL: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/w/wi/wiederfindungsrate.glos.html>
- URL 16 (15/08/2012): *Glossar*. URL: http://www.analytik.de/component/option,com_alphacontent/section,8/cat,182/Itemid,724/
- URL 17 (15/08/2012): *Nachweisgrenze*. URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Nachweisgrenze>
- URL 18 (15/08/2012) Prohaska, Thomas: *Validierung von Messmethoden*. URL: http://www.chemie.boku.ac.at/fileadmin/_/H77/LVA/771119/Skriptum_Einheit_2_-_Validierung.pdf
- URL 19 (15/08/2012): *Bestimmungsgrenze*. URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bestimmungsgrenze>
- URL 20 (16/08/2012): *Material Safety Data Sheet: 2-Vinylpyridin*. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=de&productNumber=132292&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F132292%3Flang%3Dde>
- URL 21 (16/08/2012): *Material Safety Data Sheet: 1-Methyl-2-vinyl-pyridinium-*

triflat. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=de&productNumber=69701&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F69701%3Flang%3Dde>

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Bad Elster, den 23. August 2012

Grit Nancke